



TITLE:

薬物の肝臓内動態評価のための局  
所モーメント解析に関する研究(  
Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

安井, 裕之

---

CITATION:

安井, 裕之. 薬物の肝臓内動態評価のための局所モーメント解析に関する研究. 京都大学, 1996, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

1996-07-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3117174>

RIGHT:

薬物の肝臓内動態評価のための  
局所モーメント解析に関する研究

1996

安 井 裕 之

# 目 次

緒言	.....	1
第 I 章 肝灌流実験系における薬物の肝組織移行と肝内代謝過程の 局所モーメント解析	.....	2
第 1 節 肝血流速変化に伴う肝静脈側溶出濃度推移の 局所モーメント値に関する考察	.....	2
1-1. 肝臓移行薬物動態モデル	.....	3
1-2. Dispersion Model に基づく肝静脈側溶出薬物濃度の解析法	.....	4
1-3. 局所モーメントに基づく肝静脈側溶出薬物濃度の解析法	.....	6
1-4. ラット肝臓灌流実験法	.....	8
1-5. 灌流液中薬物定量法	.....	10
1-6. 肝静脈側溶出濃度の時間推移と非平衡拡散モデルによる 解析結果及び肝局所モーメント特性値	.....	10
1-7. 灌流液速度の変化に伴う R 値の変動に関する考察	.....	15
1-8. 灌流液速度の変化に伴う肝局所モーメント特性値の 変動に関する考察	.....	16
1-9. 局所モーメント解析法の特徴	.....	17
第 2 節 肝障害時の薬物肝局所動態の変動と局所モーメント値 による評価	.....	18
2-1. 四塩化炭素投与による急性肝障害の誘導	.....	18
2-2. ラット肝臓灌流実験法及び灌流液中薬物定量法	.....	19
2-3. 四塩化炭素誘導肝障害による病態生理学的変化	.....	19
2-4. 肝静脈側溶出濃度の時間推移と肝局所モーメント特性値	.....	20
2-5. 急性肝障害による BSA の肝移行動態の変動	.....	24
2-6. 急性肝障害によるオキサシリンの肝移行動態の変動	.....	24
2-7. モデル依存的解析法と局所モーメント解析法の関係	.....	25

第3節 肝臓灌流系における薬物代謝過程の局所モーメント解析	.....	26
3-1. 局所モーメント解析に基づく局所薬物代謝過程の評価法	.....	26
3-2. 肝臓灌流実験法及び灌流液中薬物濃度定量法	.....	27
3-3. 肝静脈側溶出濃度の時間推移と肝局所モーメント特性値	.....	28
3-4. 投与量の上昇に伴う代謝過程の変動	.....	32
3-5. 考察	.....	32

第II章 肝灌流実験系における薬物の細胞内移動と胆汁中排泄過程の局所モーメント解析	.....	34
-------------------------------------------	-------	----

第1節 新規肝細胞内移動拡散モデルに基づく薬物の肝胆系輸送過程の分離評価	.....	34
1-1. 肝細胞内移動拡散モデル	.....	35
1-2. ラット肝臓灌流実験法及び灌流液中薬物定量法	.....	39
1-3. 数値計算方法	.....	40
1-4. 肝細胞内移動拡散モデルに基づく薬物肝胆系輸送のシミュレーション	.....	41
1-5. 肝静脈側溶出濃度の時間推移と肝局所モーメント特性値	.....	43
1-6. 肝細胞内拡散モデルによる胆汁中排泄の時間経過に対する当てはめ計算結果	.....	44
1-7. 肝細胞内拡散に関する考察	.....	47
1-8. 肝胆系輸送動態の律速段階過程	.....	48
1-9. タウロコール酸添加による胆汁流量増加が肝胆系輸送に及ぼす影響	.....	49
1-10. <i>in vivo</i> 胆汁排泄動態モデルとの比較	.....	51

第2節 代謝過程を含んだ胆汁中排泄過程のモデル非依存的な局所モーメント解析	.....	53
---------------------------------------	-------	----

2-1. 代謝過程を含んだ胆汁中排泄動態のモデル非依存的な局所モーメント解析	.....	54
2-2. ラット肝臓灌流実験法及び灌流液中薬物定量法	.....	56
2-3. 肝静脈側溶出濃度の時間推移と肝局所モーメント特性値	.....	57
2-4. 胆汁中排泄の時間経過と肝局所モーメント特性値	.....	58
2-5. 光学対掌体間における胆汁中排泄過程の立体選択性	.....	60
2-6. 胆汁中排泄から推定した肝臓内におけるキラル変換過程の評価	.....	62

第III章 全身動態系における薬物腸肝循環の局所モーメントの評価	.....	63
----------------------------------	-------	----

第1節 再循環理論に基づく定速注入時の全身系薬物動態における腸管循環特性と胆汁中排泄の評価	.....	63
1-1. 定速注入時における薬物の腸肝循環を評価するための再循環モデル	.....	64
1-2. 持続注入時の腸肝循環特性を表す局所モーメントと全身系モーメントとの関係	.....	65
1-3. 持続注入時の胆汁中累積排泄量と局所モーメントとの関係	.....	68
1-4. 数値計算法	.....	70
1-5. 動物実験法及び血漿中濃度定量法	.....	71
1-6. 血漿中濃度及び胆汁中排泄量に対する当てはめ計算結果と局所モーメント特性値	.....	72
1-7. 考察	.....	74

第2節 代謝過程を含んだ薬物腸管循環のモデル非依存的な局所モーメント解析	.....	76
--------------------------------------	-------	----

2-1. 代謝過程を含んだ薬物の腸肝循環動態のモデル非依存的な局所モーメント解析	.....	76
------------------------------------------	-------	----



2-2.	数値計算法	.....	80
2-3.	動物実験法及び血漿中濃度定量法	.....	80
2-4.	血漿中濃度及び胆汁中排泄量の時間推移と腸肝循環による モーメント値の変動	.....	81
2-5.	局所モーメント特性値による立体選択的な腸肝循環と 体内異性化の分離評価	.....	85
2-6.	考察	.....	87
結論		.....	88
謝辞		.....	90
論文目録		.....	91
引用文献		.....	92

## 緒 言

薬物の生体内挙動を定量的に把握することは、薬理効果発現の評価、投与計画の設定、病態時の動態変動の予測、製剤設計等において不可欠である。生体は多くの臓器から成り立ち、全身系での薬物動態は各臓器と薬物との相互作用の総和により決定されるので、個々の臓器系における薬物局所動態を明確にすることは重要である。肝臓は主たる薬物処理臓器であり、経口投与された薬物の生物学的利用能にも大きく関与する。また最近では、切除不能な肝転移癌の治療を目的として、肝動脈内薬物注入による局所灌流法が開発され、臨床的に実用化されている。従って、肝臓内における薬物局所動態を詳細に解析することは、ますます重要な課題となっている。

著者は、臓器レベルにおける分布、消失、代謝、排泄といった薬物肝局所動態の機構解明と解析法の確立を目的として研究を行った。実験系としては、血液循環から分離され組織構造を保持した *in situ* 肝灌流法を選んだ。薬物の肝静脈溶出濃度と胆汁中排泄量の時間推移から、薬物及び代謝物の肝臓内挙動を定量的に把握するための局所モーメント解析に基づく評価法を確立した。また、再循環理論を導入することにより、全身動態系におけるモーメント特性値から薬物の腸肝循環動態を含む肝局所モーメント特性値を推定するための解析法を開発した。さらに、開発した解析法を用いて、光学対掌体薬物の立体選択的な肝局所動態に関しても検討を行った。

以下、3 章にわたりこれらの結果について論述する。



## 第1章 肝灌流実験系における薬物の肝組織移行と肝内代謝過程の局所モーメント解析

肝灌流実験系における薬物の肝静脈側溶出濃度の時間経過の解析には、血液部と肝組織との間の薬物分配が非平衡過程で表されると仮定した非平衡拡散モデルが既に構築されており、種々の薬物データの評価に適用されている。しかし、誘導されるモデル式がラプラス変換形であるため、パラメータを推定するには高速ラプラス逆変換を組み込んだ高度な数値計算を要する。一方、肝局所モーメントは簡便な積分計算により求めることができる。そこで第1章では、モデルパラメータと局所モーメントとの関係を整理することにより、肝静脈側溶出濃度の時間推移から分布、消失といった薬物の組織移行を評価する新しい局所モーメント解析法を確立した。さらに、局所モーメント解析法を臓器灌流系における薬物代謝の速度論的評価にも適用した。

### 第1節 肝血流速度変化に伴う肝静脈側溶出濃度推移の局所モーメント値に関する考察

肝臓は主たる薬物処理臓器であり、大部分の薬物は肝臓で代謝や胆汁排泄されることにより体内から消失する。従って、薬物の全身系体内動態を理解するためには、臓器レベルでの肝臓内薬物挙動を把握することが必要不可欠である。薬物の肝消失は、様々な生理的要因や薬物動態の各素過程により影響を受ける。例えば、肝血流速度(1)、血漿中蛋白結合(2)、肝シヌソイド側膜を通しての取り込み(3, 4)、細胞内輸送や結合蛋白による貯留(5-7)、肝細胞内のカルシウムイオン濃度やグルタチオン濃度の調節機構(8)、酵素の代謝能力(9)、胆管側膜からの排泄(10, 11)などである。

上述した肝臓の血流速度は、薬物の肝局所動態を特徴づける重要な因子の一つである。肝血流速度は常に一定値を維持するのではなく、生体の様々な状況に応じてしばしば変動する(12)。血流速度による肝機能の変化は、体内における全身系薬物動態に大きく影響するため、血流速度と肝局所動態との関係を理解することは重要である。多くの薬物の肝クリアランスは、ラット肝を用いた臓器灌流実験系によって定常濃度状態において調べられており、しばしば肝血流速度により影響されることが知られている(13-15)。最近では、薬物の肝局所動態に及ぼす肝血流速度の影響が、非定常状態のラット肝灌流実験系におい

て dispersion model によって詳細に解析されており、薬物の肝血液部における混合度は血流速度に依存しないことが明らかにされている(1)。

*in situ* 肝灌流実験系は生理機能と組織構造を保持し、肝血流量などの生理的要因を固定した状態で薬物肝局所動態を調べるのに非常に有用であり、多くの薬物の臓器レベルにおける肝局所動態を評価するために用いられてきた。著者は、この肝灌流実験系でより多くの情報を得られる瞬時投与法を採用し、実験を行った。本節では、マーカー物質を瞬時投与後の肝静脈側溶出濃度の時間推移を局所モーメント特定値により評価する方法を新たに確立した。さらに、牛血清アルブミン(BSA)を血管部マーカーとして、またオキサシリンを高肝抽出率を有するモデル薬物として用いて、肝血流速度の変化が BSA とオキサシリンの肝局所動態におよぼす影響について詳細に評価することを試みた。

#### 1-1. 肝臓移行薬物動態モデル

肝臓灌流実験は、薬物を門脈側より瞬時投与あるいは定速注入し、肝静脈側の溶出液中の薬物濃度の推移を測定する single-pass 法と、薬物を含む灌流液を再循環させて灌流液中の薬物濃度の推移を測定する recirculation 法との二つの実験系に大別される。それぞれの実験系における薬物濃度の時間推移を説明するために、肝臓移行動態を表わす種々のモデルが考案され、多くの薬物の肝内挙動が解析されている。最も簡単な基本的モデルとして、well-stirred モデル(16, 17)と parallel tube モデル(16, 18)とがある。well-stirred モデルでは、血管内は完全混合状態で、薬物が臓器内で瞬時に均一濃度に分布すると仮定する。parallel tube モデルでは、血管内で薬物は全く拡散せず、パルスの状態で移動すると仮定する。さらに、薬物の組織への分配を考慮したモデルとして finite mass transfer resistance モデルが提案されている(19)。また、肝臓内の各シヌソイドにおける代謝酵素や血流速度の分布を考慮した distributed モデル(20, 21)や、これに multiple indicator dilution(MID)法を組み合わせた解析法(22-25)によって、肝灌流実験における single-pass 実験系の溶出濃度推移が評価されている。その後、血流方向の薬物の拡散を考慮した dispersion モデルが化学工学の分野から導入された(26-28)。

近年、矢野らはクロマトグラフィーの分野における波形解析理論として発展した dispersion モデル(29)を、臓器レベルの薬物速度論の分野に導入して、肝臓灌流実験系



の肝静脈側への薬物溶出濃度の解析に適用し、その有用性を明らかにした(30-32)。この非平衡拡散モデル(non-equilibrium dispersion モデル)では、臓器血管内における血流方向への薬物の拡散過程を考慮し、さらに血液部と肝組織との間の薬物分配が非平衡過程で表されると想定している。しかし、誘導されるモデル式がラプラス変換形であるため、溶出薬物濃度に対するあてはめ計算からモデルパラメータを推定する際には、高速ラプラス逆変換を組み込んだ非線型最小二乗法による高度な数値計算を要する。一方、局所モーメント特性値は簡便な積分計算により求めることができ、ラプラス次元のモデル式との対応も容易である。非平衡拡散モデルにおける各パラメータは、血液部での薬物の拡散、肝血液部体積、肝組織への分配や消失等に関する情報を与える。これらのモデルパラメータと肝局所モーメント特性値との関係を明らかにすれば、薬物の肝臓移行動態を局所モーメント解析に基づいて詳細に評価することが可能となる。そこで、著者は、薬物の肝静脈側溶出濃度の時間推移を、肝臓内挙動が非平衡拡散モデルに従うと仮定して、局所モーメント解析によって評価する方法を新たに開発した。

## 1-2. Dispersion Model に基づく肝静脈側溶出薬物濃度の解析法

最初に、肝臓内に薬物を瞬時投与した後の肝静脈側溶出濃度推移を解析する際に用いられる非平衡拡散モデルについて説明する。また、以下で述べる肝臓内局所動態に関する速度過程はすべて線形過程であると考ええる。

薬物は、門脈側から瞬時投与、即ちパルスとして肝臓内に送られる。このときの入力関数は、デルタ関数に近似できる。薬物は、肝血液部と肝組織との間で非平衡分配し、一部は肝組織へと消失する。その後、肝静脈側から流出し、溶出濃度の時間推移として観測される。Fig. I-1 に非平衡拡散モデルの模式図を、(I-1)式にラプラス次元のモデル式を示した。

$$\tilde{C}(s) = \frac{M}{Q} \cdot \exp \left[ \frac{QV_B}{2D_c} \left\{ 1 - \sqrt{1 + \frac{4D_c}{Q^2} \left( s + k_{12} + k_e - \frac{k_{12} \cdot k_{21}}{s + k_{21}} \right)} \right\} \right] \quad (I-1)$$

ここで、 $M(\mu\text{g or mg})$  は投与量、 $Q(\text{ml/min})$  は灌流液流速、 $D_c(\text{ml}^2/\text{min}) (=D_e \cdot A^2)$  は肝血液部での補正拡散係数、 $D_e(\text{cm}^2/\text{min})$  は有効拡散係数、 $A(\text{cm}^2)$  は肝血液部の断面積、 $V_B(\text{ml})$  は肝血液部体積であり、 $V_B$  は sinusoid 空間及び Disse 腔の体積の和として定

義される。また、 $k_{12}(\text{min}^{-1})$  と  $k_{21}(\text{min}^{-1})$  は血液部と肝組織との間の可逆的移行速度定数、 $k_e(\text{min}^{-1})$  は血液部から肝組織への一次消失(不可逆的移行)速度定数である。 $k' (k_{12}/k_{21})$  は薬物量で定義される分配比であり、血液部と肝組織との間の可逆的分布の程度に対する指標である。拡散モデルには、peripheral compartment から薬物が消失すると仮定したモデルも存在するが、central compartment から薬物が消失すると仮定した上述の拡散モデルと速度論的には等価であることが既に表示されている(30)。また、central 消失モデルにおいては、薬物の消失は血液部から肝組織への不可逆的な移行を表し、薬物の分布は血液部と肝組織との間の可逆的な移行を表す。

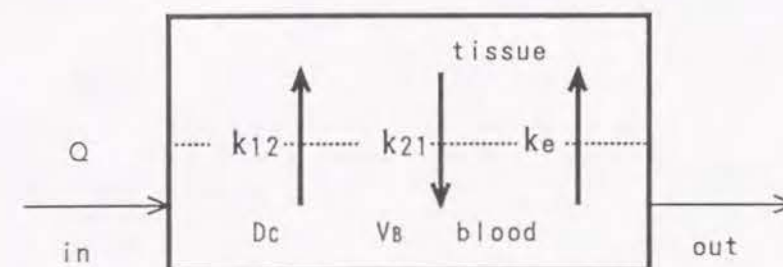


Fig. I-1 Non-equilibrium dispersion model with elimination from central compartment.  $Q$ : flow rate,  $D_c$ : corrected dispersion coefficient,  $V_B$ : volume of blood space,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ : forward and backward transfer rate constant,  $k_e$ : irreversible transfer (elimination) rate constant.

(I-1)式における非平衡拡散モデルの各パラメータと肝局所モーメントとの間には以下の関係が成立する(30)。(I-2)～(I-4)式は、元々の関係式を再整理したものである。

$$F_H = \lim_{s \rightarrow 0} \frac{\tilde{C}(s)}{M/Q} = \exp \left[ \frac{QV_B}{2D_c} \left\{ 1 - \sqrt{1 + \frac{4D_c k_e}{Q^2}} \right\} \right] \quad (I-2)$$

$$\bar{t}_H = \lim_{s \rightarrow 0} - \frac{d}{ds} \ln \tilde{C}(s) = \frac{V_B(1+k')}{Q} \sqrt{1 + \frac{4D_c k_e}{Q^2}} \quad (I-3)$$

$$\begin{aligned} \sigma^2 / \bar{t}_H^2 &= \lim_{s \rightarrow 0} \frac{d^2}{ds^2} \ln \tilde{C}(s) / \bar{t}_H^2 \\ &= \frac{2D_c}{QV_B} \sqrt{1 + \frac{4D_c k_e}{Q^2}} + \frac{2k'Q}{k_{21}V_B(1+k')^2} \sqrt{1 + \frac{4D_c k_e}{Q^2}} \end{aligned} \quad (I-4)$$



ここで、 $F_H$  は肝通過率、 $\bar{t}_H$  は平均肝通過時間、 $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  は通過時間の相対分散比である。(I-2)式及び(I-3)式は、平衡拡散モデルの局所モーメント式に一致する。一方、(I-4)式は、相対分散比が拡散に関与する第一項及び薬物の非平衡分配に関与する第二項から成ることを示しており、 $k_{21}$  が十分大きい時には第二項が無視され平衡拡散モデルの局所モーメント式に一致する。従って、 $k_{21}$  は血液部と肝組織との間の薬物分布の非平衡性を表す指標である。

また、無次元化したパラメータである dispersion number  $D_N$  及び efficiency number  $R_N$  は、以下に示す(I-5)及び(I-6)式により与えられる。

$$D_N = \frac{D_c}{QV_B} \quad (I-5)$$

$$R_N = \frac{k_e V_B}{Q} \quad (I-6)$$

薬物を瞬時投与した後の肝静脈側溶出濃度の時間推移に対する(I-1)式の当てはめ計算は、高速ラプラス逆変換(FILT)を組み込んだ最小二乗法プログラム MULTI(FILT)を用いて、京都大学大型計算機センターの大型コンピュータ上で実行した(33, 34)。血液部マーカー物質であるBSAは、肝臓内では消失しないので、(I-1)式における消失速度定数  $k_e$  を0と仮定して計算を行った。肝局所モーメント特性値は、当てはめ計算によって推定された各モデルパラメータの値を用いて(I-2)～(I-4)式から算出した。

### 1-3. 局所モーメントに基づく肝静脈側溶出薬物濃度の解析法

局所モーメント特性値を指標にして薬物の肝局所動態を評価するためには、前述した局所モーメントを表す(I-2)～(I-4)式をより理解し易い式へと簡素化すると都合がよい。(I-2)～(I-4)式には、共通した平方根の項が含まれる。この項を  $R$  値と呼ぶことにする。(I-5)式及び(I-6)式より(I-7)式が与えられる。

$$R = \sqrt{1 + \frac{4D_c k_e}{Q^2}} = \sqrt{1 + 4D_N R_N} \quad (I-7)$$

(I-2)～(I-4)式における  $4D_c \cdot k_e / Q^2$  の値は、肝一回通過により約50%から80%が消失する高肝クリアランス薬物の場合でさえも1よりかなり小さな値となり、 $R$  値はほぼ1に近い(30, 35)。これより(I-2)～(I-4)式は、それぞれ単純な(I-8)～(I-10)式へと近似される。

$$F_H = \exp\left[-\frac{k_e \cdot V_B}{Q}\right] \quad (I-8)$$

$$\bar{t}_H = \frac{V_B(1+k')}{Q} \quad (I-9)$$

$$\sigma^2/\bar{t}_H^2 = \frac{2D_c}{QV_B} + \frac{2k'Q}{k_{21}V_B(1+k')^2} \quad (I-10)$$

(I-8)式は、(I-2)式で  $4D_c \cdot k_e / Q^2$  に関するテイラー展開をすることにより誘導した。(I-9)式は、クロマトグラフィーの分野における保持時間に対する理論式と等しく、また(I-10)式は、理論段高さに対する理論式に対応している(36)。(I-8)式が示すように、肝通過率  $F_H$  は、肝組織への分布や肝血液部での拡散に関与するパラメータと無関係となり、薬物消失の程度を表す指標であることが分かる。同様に(I-9)式からは、平均肝通過時間  $\bar{t}_H$  は薬物の消失や拡散に関与するパラメータと無関係となり、薬物分布の程度を表す指標であることが理解される。(I-8)、(I-9)式から、消失の程度を表すパラメータである efficiency number  $R_N$  と、肝臓への見かけの分布容積  $V_H$  は、以下に示す(I-11)、(I-12)式から簡単に計算することができる。

$$R_N = -\ln(F_H) \quad (I-11)$$

$$V_H = Q \cdot \bar{t}_H \quad (I-12)$$

(I-10)式において、相対分散  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  は、薬物の消失から独立した二つの項により構成されている。(I-10)式の右辺の第一項は、肝血液部における拡散に関与する項であり、第



二項は、血液部から肝組織への非平衡分配に関与する項である。つまり、相対分散  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  は、薬物の血液部での拡散と組織への非平衡分配の総和を表す指標である。

肝局所モーメント特性値は、山岡らのモデル非依存的方法(37, 38)に基づいた(I-13)～(I-15)式に示す定義式に従い計算した。即ち、実測点に対しては線形台形公式による積分計算を適用し、また terminal phase に対しては最小二乗法により一次速度式に当てはめて無限時間まで外挿した値を算出した。

$$F_H = \frac{\int_0^\infty C(t)dt}{M/Q} \quad (I-13)$$

$$\bar{t}_H = \frac{\int_0^\infty t \cdot C(t)dt}{\int_0^\infty C(t)dt} \quad (I-14)$$

$$\sigma^2/\bar{t}_H^2 = \frac{\int_0^\infty (t - \bar{t}_H)^2 \cdot C(t)dt}{\int_0^\infty C(t)dt} \bigg/ \bar{t}_H^2 \quad (I-15)$$

#### 1-4. ラット肝臓灌流実験法

Fig. I-2 に示すように、Mortimore 肝灌流法(39)に基づく *in situ* single-pass 系灌流実験を行った。Wistar 系雄性ラットをペントバルビタール麻酔下で開腹し、総胆管にポリエチレンチューブ(120 mm x 0.3 mm i.d., 0.6 mm o.d.)を挿入する。灌流液には、10 mM のブドウ糖を含み 95 % O<sub>2</sub>-5 % CO<sub>2</sub> ガスで平衡化した Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液(pH 7.4)を使用し、実験期間中は 37℃に維持した。アルブミン及び赤血球は、それらの肝臓内薬物挙動への影響を除くために、灌流液中には加えなかった。ポリエチレンチューブ(1.67 mm o.d.)を挿入した門脈から、灌流液をペリスタポンプ(RP-N3、フルエ科学株式会社)を用いて一定流速で肝臓内へと注入し、肝静脈から流出させた。オキサシリン(Sigma 社)を高い肝抽出率を有するマーカー薬物として、BSA(fatty acid-free, fraction V, Sigma 社)を肝血液部マーカーとして使用した。灌流液の流速は、Rowland らによって採用されている 15 ml/min を基準として(28, 40, 41)、オキサシリンでは 10, 15, 20, 25 ml/min の四段階に設定し、BSAでは 15, 25 ml/min の二段階に設定した。灌

流液の回収率は、全ての流速において 99 % 以上であった。20 分の安定期間の後、オキサシリン(5.0 mg/ml)あるいは BSA(3.85 mg/ml Evans Blue, 40 mg/ml BSA)を溶解させた灌流液 0.100 ml を六方バルブインジェクタ(サヌキ工業株式会社)を用いて、門脈内に挿入したカニューレから肝臓内へ瞬時投与した。肝静脈に挿入したカニューレから、溶出液を約 1 秒ごとに 1 分間採取した。各溶出サンプルの正確な採取時間は、灌流液の流出体積から算出した。肝臓の活性は、胆汁流量により確認した。

薬物が灌流装置のカニューレを通過する平均時間と、カニューレ内での広がりを出す分散値は、門脈カニューレと肝静脈カニューレとを直接連結して Evans Blue 溶液を瞬時注入し、10, 15, 20, 25 ml/min の各流速における溶出波形のモーメントから求めた。局所モーメント計算を行う前に、あらかじめ薬物の溶出データからカニューレの通過時間を差し引いた。一方、通過時間の分散値は、最も低流速の 10 ml/min においても 0.5 sec<sup>2</sup> 以下であり、肝灌流時の溶出曲線の分散値と比較すると 3.0 % 以下であったので、各流速におけるカニューレ内での薬物の広がりは無視できるとした。

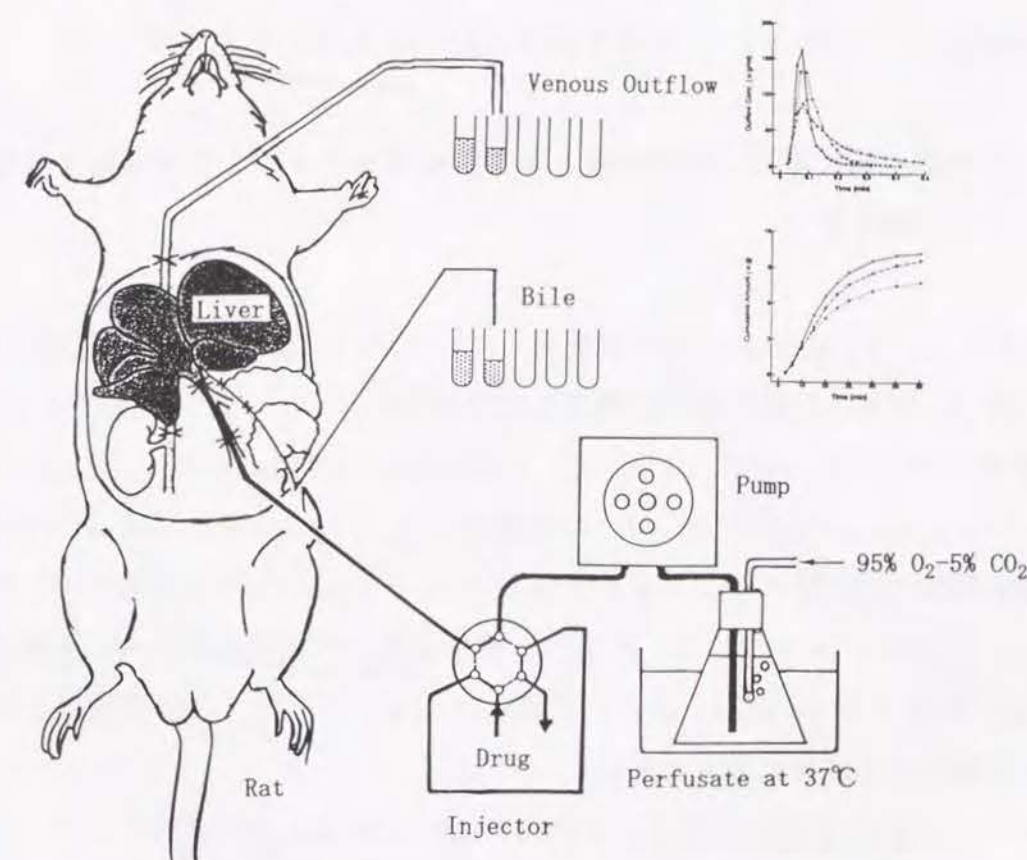


Fig. I-2 Single-pass rat liver perfusion system.



## 1-5. 灌流液中薬物定量法

BSA の灌流液中濃度は、BSA-Evans Blue 複合体として 620 nm における吸光度 (UV-1200, 島津製作所) により定量した (42)。Evans Blue で標識された BSA の検量線の相関係数は、3.0-100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲において 0.999 以上であった。各サンプルをこの濃度範囲に希釈した後、吸光度を測定した。

オキサシリンの灌流液中濃度は、HPLC 法により定量した。HPLC システム (LC-6A、島津製作所) は、UV detector (SPD-6A、島津製作所) を検出器、Chemcosorb 5-ODS-H (4.6 mm i.d. x 150 mm、ケムコ社) を固定相とし、LiChrosorb RP-2 (4.6 mm i.d. x 50 mm、メルク社) をガードカラムとして使用した。移動相は、酢酸緩衝液 (pH 5.2) とメタノールの混液 (1:1 v/v) を用いて、流速を 1.0 ml/min とした。検出波長を 220 nm、カラム温度を 40°C に設定した。採取した溶出液の各サンプル 0.2 ml にアセトニトリル 0.3 ml を加え、攪拌後 5 分間遠心分離し、上清 15  $\mu\text{l}$  を HPLC に注入した。オキサシリンの検量線の相関係数は、1.0-200  $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲において 0.999 以上であった。

## 1-6. 肝静脈側溶出濃度の時間推移と非平衡拡散モデルによる解析結果及び肝局所モーメント特性値

Fig. I-3 に、15 ml/min の流速群 (n=4, Fig. I-3A) と 25 ml/min の流速群 (n=4, Fig. I-3B) における BSA の肝静脈側溶出濃度の時間推移を示した。また Fig. I-4 に、10 ml/min の流速群 (n=4, Fig. I-4A)、15 ml/min の流速群 (n=4, Fig. I-4B)、20 ml/min の流速群 (n=4, Fig. I-4C)、及び 25 ml/min の流速群 (n=4, Fig. I-4D) におけるオキサシリンの溶出濃度の時間推移を示した。Fig. I-3 及び Fig. I-4 の左図は通常濃度で、右図は片対数で表示した。BSA、オキサシリンともに、溶出曲線の時間推移は流速の上昇に伴って狭まり、 $C_{\text{max}}$  は低下し terminal phase の傾きは大きくなった。この傾向は、オキサシリンの溶出曲線に対して特に顕著であった。

Table I-1 及び Table I-2 に、各流速群における BSA 及びオキサシリンの非平衡拡散モデルにより推定された各パラメータ値を示した。また、肝局所モーメント特性値については、各モデルパラメータ値を用いて (I-2) ~ (I-4) 式から算出した値及び、モデル非依存的方法に従い台形公式を用いて (I-13) ~ (I-15) 式から計算した値を示した。両方の計算値

はほぼ一致し、解析結果の妥当性が示された。肝消失しない血液部マーカーである BSA の  $F_H$  は、両群ともにほぼ 100 % であった。また、25 ml/min の流速群の BSA の  $\bar{t}_H$  は、15 ml/min の流速群と比較して小さな値であったが、 $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  には両群間で有意差はなかった。一方、肝消失モデル薬物であるオキサシリンの  $F_H$  は、流速に依存せずに全ての群で 40 ~ 50 % の範囲であった。また、 $\bar{t}_H$  は流速の上昇に伴い減少したが、 $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  は流速に影響されずに全ての群間で有意差はなかった。

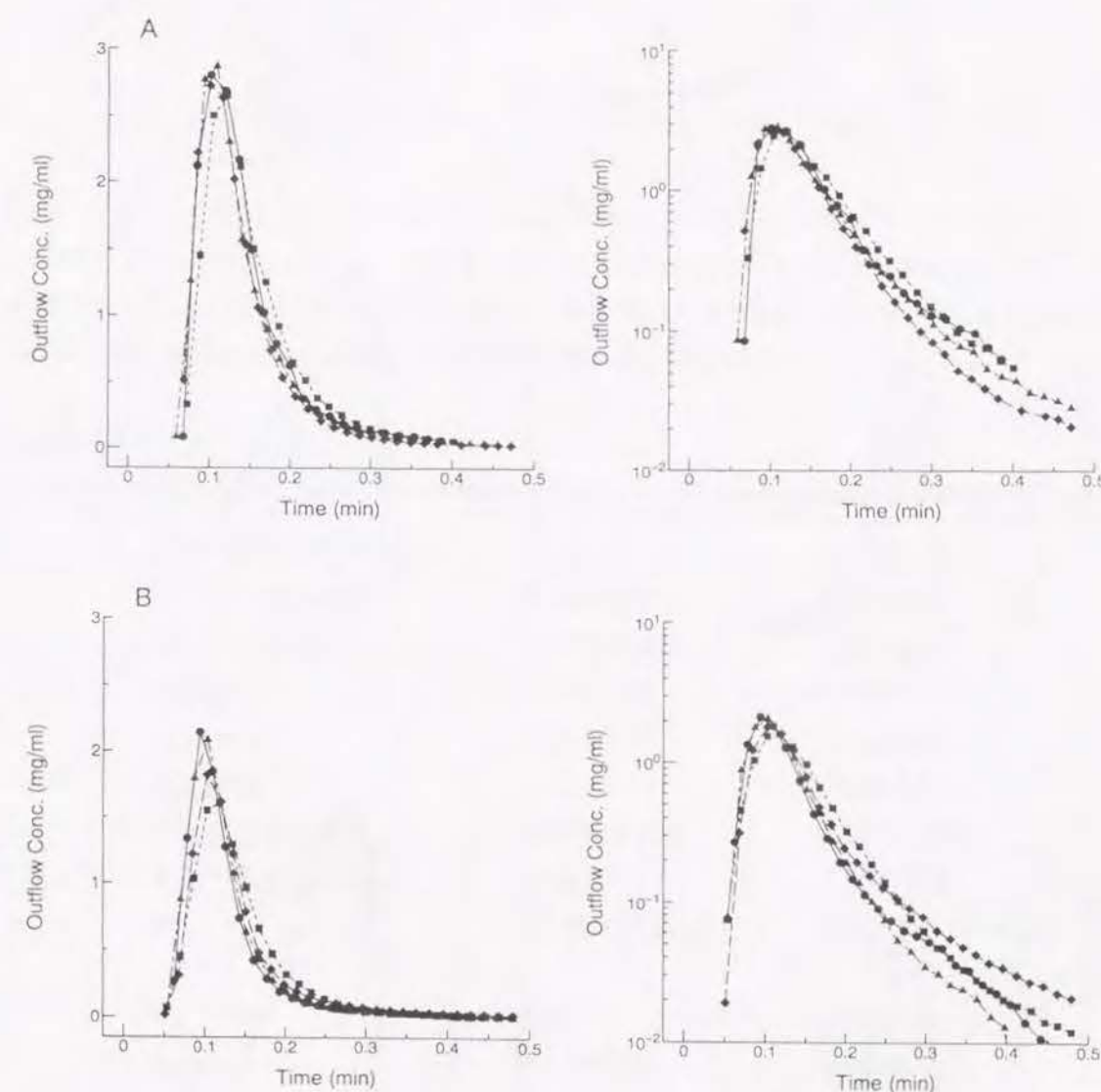


Fig. I-3 Venous perfusate concentration vs. time plots of BSA in (A) 15 ml/min of flow rate group and (B) 25 ml/min of flow rate group. The left panel is normal scale and the right panel is semi-logarithmic scale. (Dose=4.0mg)



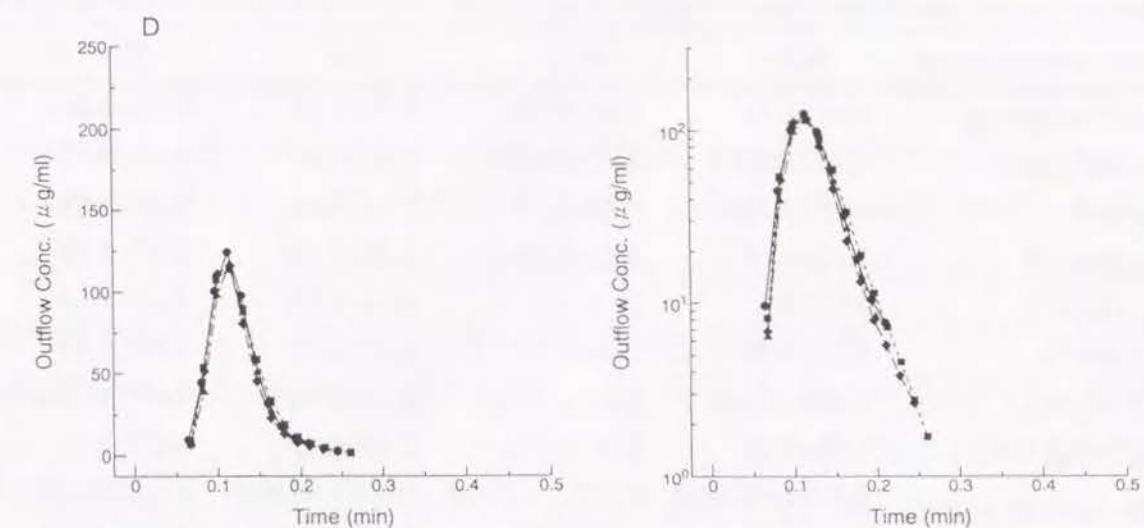
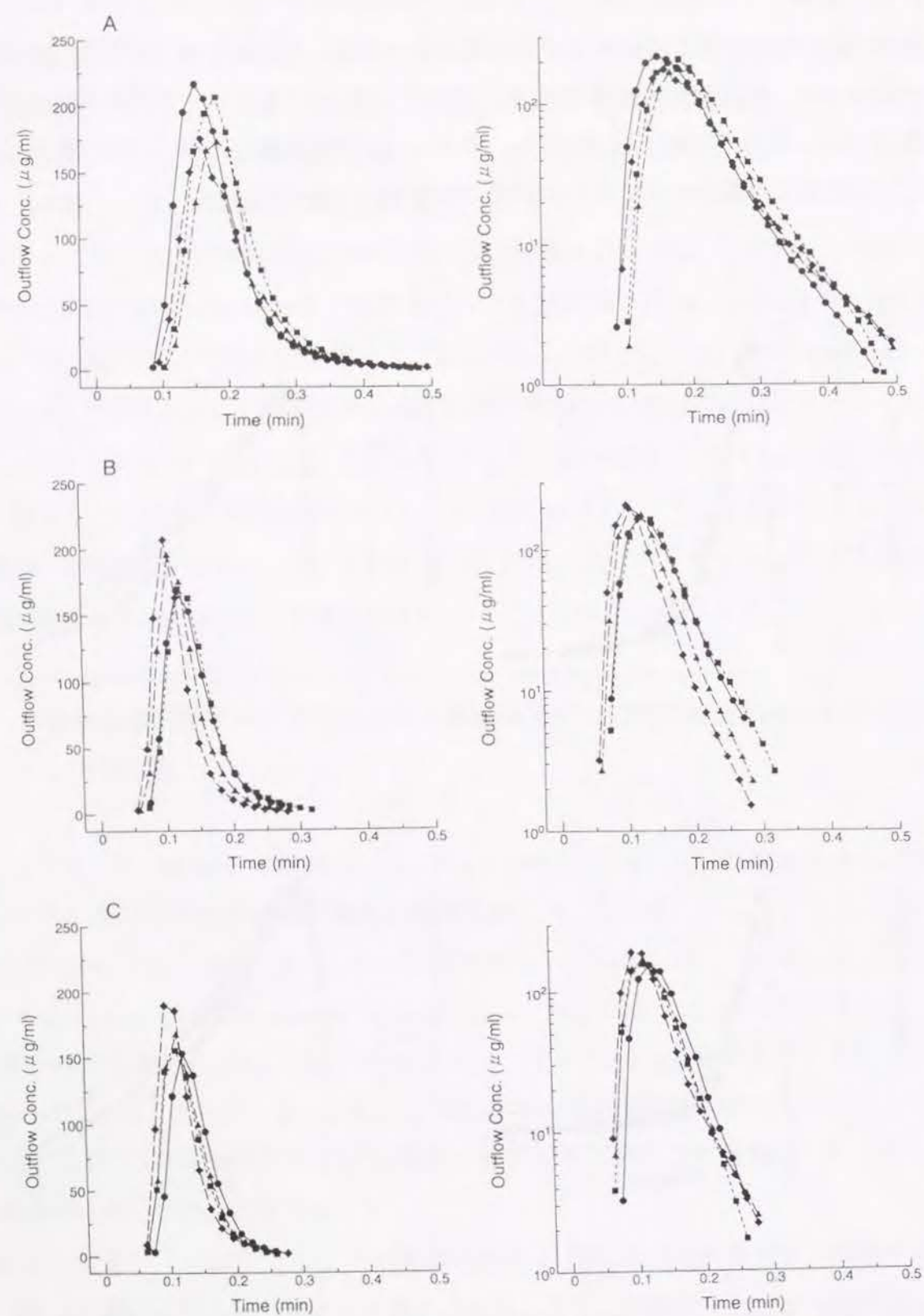


Fig. I-4 Venous perfusate concentration vs. time plots of oxacillin in (A) 10 ml/min group, (B) 15 ml/min group, (C) 20 ml/min group, and (D) 25 ml/min group. The left panel is normal scale and the right panel is semi-logarithmic scale. (Dose=0.50mg)

Table I-1

Moment values and kinetic parameters of BSA in two-compartment dispersion model

Flow rate (ml/min)	15.0	25.0
Liver weight (g)	8.73±0.59	8.99±1.01
$D_c$ (ml <sup>2</sup> /min)	0.788±0.092	2.45±0.60
$V_B$ (ml)	1.76±0.08	2.88±0.20
$k_{12}$ (min <sup>-1</sup> )	4.20±0.99	2.54±0.54
$k_{21}$ (min <sup>-1</sup> )	14.2±2.3	10.9±0.9
$k' (=k_{12}/k_{21})$	0.293±0.034	0.237±0.062
$V_H (=V_B(1+k'))$	2.28±0.07	3.55±0.24
$D_N$	0.0298±0.0032	0.0327±0.0061
$F_H$ (%) <sup>a</sup>	100	100
$\bar{t}_H$ (sec) <sup>a</sup>	9.11±0.28	8.52±0.58
$\sigma^2/\bar{t}_H^2$ <sup>a</sup>	0.274±0.042	0.316±0.052
$F_H$ (%) <sup>b</sup>	99.3±2.5	98.6±1.1
$\bar{t}_H$ (sec) <sup>b</sup>	8.90±0.42	8.18±0.65
$\sigma^2/\bar{t}_H^2$ <sup>b</sup>	0.292±0.028	0.278±0.041

Results are reported as mean±s.d. of four rats.

<sup>a</sup> Calculated by Eqs. (I-2)-(I-4). <sup>b</sup> Calculated by trapezoidal integration into infinite time.



Table I-2

Moment values and kinetic parameters of oxacillin in two-compartment dispersion model

Flow rate (ml/min)	10.0	15.0	20.0	25.0
Liver weight (g)	9.65±1.16	8.05±0.88	9.91±1.21	8.92±0.83
$D_c$ (ml <sup>2</sup> /min)	0.327±0.011	0.628±0.078	1.01±0.07	1.69±0.15
$V_B$ (ml)	1.73±0.12	1.88±0.17	2.41±0.12	3.03±0.05
$k_{12}$ (min <sup>-1</sup> )	5.13±0.65	3.33±0.83	4.36±1.48	2.47±1.29
$k_{21}$ (min <sup>-1</sup> )	34.2±4.6	29.0±5.2	41.9±13.2	32.9±13.3
$k_e$ (min <sup>-1</sup> )	5.23±0.59	7.40±0.97	6.33±0.27	7.87±0.32
$k' (=k_{12}/k_{21})$	0.153±0.029	0.114±0.009	0.103±0.059	0.0795±0.0256
$V_H (=V_B(1+k'))$	1.99±0.10	2.09±0.19	2.66±0.13	3.27±0.07
$D_N$	0.0191±0.0018	0.0223±0.0010	0.0211±0.0020	0.0223±0.0018
$R_N$	0.902±0.119	0.915±0.037	0.761±0.048	0.954±0.044
$F_H$ (%) <sup>a</sup>	41.5±4.7	40.8±1.5	47.3±2.3	39.3±1.7
$\bar{t}_H$ (sec) <sup>a</sup>	11.5±0.6	8.04±0.75	7.72±0.39	7.54±0.17
$\sigma^2/\bar{t}_H^2$ <sup>a</sup>	0.0787±0.0143	0.0969±0.0079	0.0818±0.0220	0.0911±0.0160
$F_H$ (%) <sup>b</sup>	42.6±4.2	41.2±1.6	47.8±2.5	40.5±2.4
$\bar{t}_H$ (sec) <sup>b</sup>	11.9±0.6	8.01±0.74	7.70±0.43	7.41±0.07
$\sigma^2/\bar{t}_H^2$ <sup>b</sup>	0.116±0.021	0.0998±0.0037	0.0859±0.0166	0.0862±0.0104

Results are reported as mean±s.d. of four rats.

<sup>a</sup> Calculated by Eqs. (I-2)-(I-4). <sup>b</sup> Calculated by trapezoidal integration into infinite time.

オキサシリンの各モデルパラメータについては、補正拡散係数  $D_c (=D_e \cdot A^2)$  及び肝血液部体積  $V_B$  は、流速の上昇に伴い増加したが、dispersion number  $D_N$  は一定であった。従って、 $D_c$  及び  $V_B$  の増加は、肝血液部の断面積  $A$  の増加に依るものと考えられる。また、消失速度定数  $k_e$  及び efficiency number  $R_N$  は、流速に依存せず一定であったが、分配比  $k' (=k_{12}/k_{21})$  は流速の上昇に伴い減少した。BSA の各モデルパラメータについては、 $k_e$  を除く全てのパラメータが、流速の上昇に伴いオキサシリンと同様の変動結果を示した。 $D_c$  ( $D_N$ ) 及び  $V_B$  は、薬物の特性には依存せず、肝血液部の構造に依存するパラメータであると考えられている。実際に、15 及び 25 ml/min の両流速群におけるオキサシリンと BSA との間には  $D_c$  ( $D_N$ ) 及び  $V_B$  の推定値に有意差はなかった。

1-7. 灌流液速度の変化に伴う  $R$  値の変動に関する考察

Fig. I-5 に、灌流液速度の変化に伴うオキサシリンの  $R$  値の変動結果を示した。実線は、Table I-2 の各モデルパラメータから計算した  $R$  値の変動を表している。全ての流速においてオキサシリンの  $F_H$  は約 40% であり、 $R$  値は  $1.04 \pm 0.01$  となり 1 に非常に近い値であった。一方、破線は各流速において推定されたそれぞれの  $D_N$  値を固定して  $R_N$  値を増加させたときに、(I-7) 式から予測される  $R$  値の変動を表している。結果として、 $F_H$  は 40% から 5% にまで減少したが、 $F_H$  が 5% すなわち肝抽出率  $E_H$  が 95% の時でさえも  $R$  値は 1 に近い値 ( $1.13 \pm 0.01$ ) であった。現在までの  $\beta$ -ラクタム系抗生物質を中心とした研究から、 $D_N$  は薬物の動態特性に依らず常に 0.1 未満の値であった (30-32)。本節においても、高い肝抽出率を有するモデル薬物であるオキサシリンの  $D_N$  と肝血液部マーカーである BSA の  $D_N$  はほぼ一致し、両者の  $D_N$  値は Table I-1 及び Table I-2 に示すように灌流液速度の変化に依存せず一定値であった。以上の考察より、肝臓一回通過の際に約 50% 程度までが消失する薬物に対しては、 $R$  値は薬物の動態特性に関係なく常に 1 に近い値となることが明らかとなった。

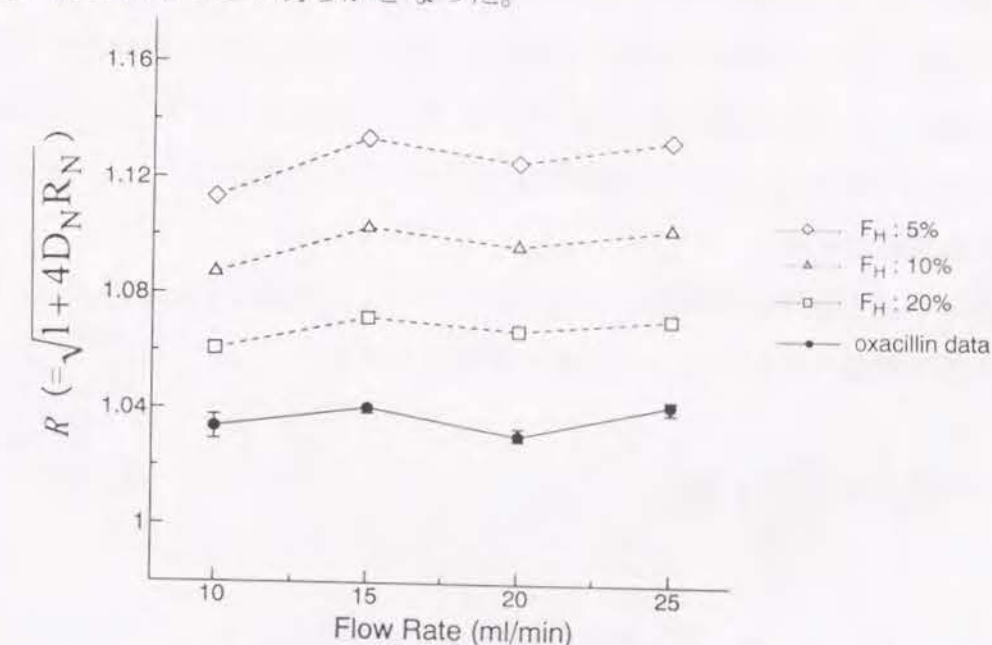


Fig. I-5 Experimental and predicted  $R (= \sqrt{1 + 4D_N R_N})$  of oxacillin versus flow rate. The closed circles ( $\bullet$ ;  $F_H=40\%$ ) are  $R$  calculated from the kinetic parameters of oxacillin in the two-compartment dispersion model. The open rectangles ( $\square$ ;  $F_H=20\%$ ), triangles ( $\triangle$ ;  $F_H=10\%$ ), and diamonds ( $\diamond$ ;  $F_H=5\%$ ) are  $R$  predicted under the condition that  $D_N$  is fixed to that of oxacillin and  $R_N$  is increased.



## 1-8. 灌流液速度の変化に伴う肝局所モーメント特性値の変動に関する考察

$F_H$  が 10% 未満であるような高肝抽出率を有する薬物の場合、定常状態条件下で流速を上昇させると、 $F_H$  は増加することが明らかにされている(14, 17)。一方、Pang らは低流速域において灌流液速度を上昇させるとフェナセチンやメペリジンといった高クリアランス薬物の  $F_H$  が低下する例を報告している(43)。本節で明らかにされたオキサシリンのように中程度の肝消失特性を有する薬物の場合には、 $F_H$  は流速に依存せず一定値を示すと推察される。これは、(I-8)式における  $k_e V_B$  が流速の上昇に比例して増加することから説明できる。実際に、オキサシリンと BSA 両方の  $V_B$  値は、流速が 15 ml/min から 25 ml/min へ上昇するに従い約 2 倍程度まで増加しており、この現象は血流速度の上昇に伴い臓器の血液部体積が増加するという知見と一致している(43, 44)。また、台形公式より算出した  $F_H$  を用いて(I-11)式から求めた  $R_N$  と、Table I-2 に示した各モデルパラメータから求めた  $R_N$  とを比較するとほぼ一致した値となり、(I-8)式及び(I-11)式の妥当性も確認された。

オキサシリンと BSA の  $\bar{t}_H$  は、非常に近い値である。これは、オキサシリンと BSA が(I-9)式においてほぼ同程度の小さな  $k'$  値をとることから説明できる。また、台形公式より算出した  $\bar{t}_H$  を用いて(I-12)式から求めた  $V_H$  と、Table I-2 に示した各モデルパラメータから求めた  $V_H$  とを比較するとほぼ一致した値となり、(I-9)式及び(I-12)式の妥当性も確認された。

肝臓における薬物局所動態が平衡拡散モデルにより表現される時には、(I-10)式は右辺の第二項を無視できるので(I-16)式に簡略化される。

$$\sigma^2/\bar{t}_H^2 = \frac{2D_c}{QV_B} = 2D_N \quad (\text{I-16})$$

前述したように  $D_N$  は、肝血液部の構造により決定されるパラメータであり、80% 程度までの肝抽出率を有する薬物に対しては流速の変化に依存せずほぼ一定値を取り、非平衡拡散モデルを用いた解析からは最大でも約 0.1 以下の値として推定されている(30-32, 35)。従って、 $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  が 0.2 よりも大きな値を示す場合には、薬物の肝組織への非平衡分布を無視できないことになる。

## 1-9. 局所モーメント解析法の特徴

本解析法は、局所モーメント解析に基づいた薬物肝移行動態の簡便な評価法を提供するものである。肝静脈側溶出濃度推移の局所モーメント特性値について(I-8)～(I-10)式が与える指標から、肝通過率  $F_H$  は消失の程度を、平均肝通過時間  $\bar{t}_H$  は分布の程度を、相対分散  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  は肝血液部での拡散と分布の非平衡性との総和をそれぞれ表すことが明らかとなった。本法を適用することにより、dispersion モデル(28, 30)や distributed モデル(45)といった複雑な数値計算を伴う解析法を用いなくても、臓器レベルにおける薬物の肝局所動態を簡便に推定することが可能となった。



## 第2節 肝障害時の薬物肝局所動態の変動と局所モーメント値による評価

肝臓の微少脈管構造と肝機能との間には密接な関係のあることが従来より知られている(46, 47)。病態時の肝臓では、組織の形態的な特徴や酵素蛋白などの生化学的な特徴(48-50)、ならびに薬物の代謝能力(51-54)に著しい変動が生じ、薬物の全身系動態は、正常肝を有する動物と病態肝を有する動物との間では非常に異なる場合が多い(55, 56)。強力な肝毒素である四塩化炭素( $\text{CCl}_4$ )は、肝臓病の病態モデルを作製するために従来より最も汎用されており、幾つかの障害肝や病変肝で観測される組織形態の変化や、酵素レベルの生化学的变化が、この病態モデルを用いて研究されてきた(57, 58)。 $\text{CCl}_4$ の反復投与により肝硬変が発生するのに対して、単回投与では肝小葉中心の壊死や脂肪沈着を伴った急性肝障害が発生する(57-60)。この急性肝障害の主因は、肝ミクロソームに存在するチトクローム P-450 系酵素により  $\text{CCl}_4$  から代謝されたトリクロロメチルラジカルが、過酸化脂質を生成して小胞体や細胞膜を損傷するためとされている(57)。

肝硬変を伴ったラット肝を用いた臓器灌流実験系によって、肝硬変時における薬物の肝臓内動態の変動が、定常状態法や multiple indicator dilution(MID) 法により解析されており、肝クリアランスの大きな薬物の消失速度に対する肝酵素活性や肝血流量の変動の影響(61)や肝微少脈管構造の変化と肝機能変動との関連性が明らかにされている(62, 63)。一方、急性肝障害に関しては、肝機能と全身系薬物動態の変化についてかなりの報告例はあるが、肝微少循環系と薬物肝局所動態の変動についてはほとんど報告がない。

本節では、第1節と同様に *in situ* 肝灌流実験系における瞬時投与法を採用し、牛血清アルブミン(BSA)を血管部マーカーとして、オキサシリンを高肝抽出率を有するモデル薬物として用いて、 $\text{CCl}_4$ により誘導される急性肝障害が BSA 及びオキサシリンの肝局所動態におよぼす影響について詳細に評価することを試みた。第1節で確立した局所モーメント解析法を用いて、急性肝障害時に生じる肝血液部構造の変化ならびに薬物の組織分布や消失の変動を定量的に明らかにした。

### 2-1. 四塩化炭素投与による急性肝障害の誘導

Wistar 系雄性ラットを使用し、実験開始までの期間中は固形飼料と飲料水を自由に摂

取させた。 $\text{CCl}_4$  は同体積のオリーブ油に溶かして、4 ml/kg ( $\text{CCl}_4$  2 ml/kg) を単回経口投与した。この投与量の  $\text{CCl}_4$  障害によって死亡に至った例はみられなかった。正常群には、同体積量のオリーブ油のみを単回経口投与した。 $\text{CCl}_4$  投与後も、ラットには固形飼料と飲料水を自由に摂取させ、投与 48 時間後に肝灌流実験を行った。灌流実験に先立ち、ペントバルビタール腹腔内投与による麻酔下、頸静脈から採血を行った。得られた血漿中の GOT(glutamate oxaloacetate transaminase)及び GPT(glutamate pyruvate transaminase)活性は、Karmen 法(64)に従い、GOT-テストワコー及び GPT-テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いて定量した。

### 2-2. ラット肝臓灌流実験法及び灌流液中薬物定量法

ラット肝灌流実験は、第1節と同様の Mortimore 肝灌流法に基づき行った。アルブミン及び赤血球は、灌流液中には加えなかった。灌流液の流速は 15 ml/min に設定し、回収率は 99 % 以上であった。20 分の安定期間の後、オキサシリン(1.25 mg/ml)あるいは BSA(3.85 mg/ml Evans Blue, 40 mg/ml BSA)を溶解させた灌流液 0.245 ml を六方バルブインジェクタを用いて、門脈内に挿入したカニューレから肝臓内へ瞬時投与した。肝静脈に挿入したカニューレから、溶出液を約 1 秒ごとに 1 分間採取した。肝臓の活性は、胆汁流量により確認した。BSA とオキサシリンの灌流液中濃度の定量は、第1節と同様の方法により行った。

### 2-3. 四塩化炭素誘導肝障害による病態生理学的変化

以後の実験結果を示す各測定値は、平均と標準偏差により記述した。また、正常群に対する障害群の各測定値の有意性を 5% 有意水準の分散分析により比較し、判定した。

Table I-3 に、 $\text{CCl}_4$  誘導による急性肝障害後の病態生理学的変化を示した。 $\text{CCl}_4$  による障害群では正常群と比較して、血漿中の GOT 及び GPT 活性が有意に上昇した。障害群の GOT 及び GPT 活性を 5% 有意水準の分散分析により比較し、統計的に軽度の障害群と重度の障害群とに分離した。軽障害群の GOT 及び GPT 活性は、それぞれ正常群の約 6 倍の値を示したが、重障害群の GOT 及び GPT 活性は、さらに軽障害群の 2 倍以上の値を示した。灌流実験中に測定した胆汁流量は、障害群では有意に低下した。一方、体重と湿肝重量には正常群と障害群との間で有意差はなかった。



Table I-3

Pathophysiological changes after carbon tetrachloride intoxication of male Wistar rats

	Control rat (n=9)	Lightly intoxicated rat (n=4)	Heavily intoxicated rat (n=8)
Body weight (g)	224±14	211±14	221±12
Liver weight (g)	9.8±0.7	9.5±0.5	9.7±0.7
GOT (Karmen unit)	70±10	430±60 *	1110±280 *,**
GPT (Karmen unit)	40±10	250±70 *	570±100 *,**
Bile flow (μl/min/g liver)	0.80±0.23	0.15±0.04 *	0.12±0.03 *

Results are reported as mean±s.d. Numbers in parentheses represent the number of animals. The values of bile flow during the liver perfusion are listed here.

\* Significantly different from control (normal) value at 5% level of ANOVA.

\*\* Significantly different from the lightly intoxicated liver at 5% level of ANOVA.

#### 2-4. 肝静脈側溶出濃度の時間推移と肝局所モーメント特性値

Fig. I-6 に、正常群(n=5, Fig. I-6A)と重障害群(n=4, Fig. I-6B)における BSA の肝静脈側溶出濃度の時間推移を示した。また Fig. I-7 に、正常群(n=4, Fig. I-7A)、軽障害群(n=4, Fig. I-7B)、及び重障害群(n=4, Fig. I-7C)におけるオキサシリンの溶出濃度の時間推移を示した。Fig. I-6 及び Fig. I-7 の左図は通常濃度で、右図は片対数で表示した。BSA、オキサシリンともに、溶出曲線の時間推移は肝障害の進行に伴って広がり、 $C_{max}$  は低下し terminal phase の傾きは緩やかになった。この傾向は、オキサシリンの溶出曲線に対して特に顕著であった。

肝局所モーメント特性値は、第 1 節と同様に実測点に対しては線形台形公式を適用し、また terminal phase に対しては最小二乗法により一次速度式に当てはめて無限時間まで外挿した値を算出した。Table I-4 及び Table I-5 に、正常群と障害群における BSA 及びオキサシリンの肝局所モーメント特性値を示した。肝消失しない血液部マーカーである BSA の  $F_H$  は、両群ともにほぼ 100 % であった。また、障害群の BSA の  $\bar{t}_H$  は、正常群と比較して有意に大きな値であったが、 $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  には両群間で有意差はなかった。一方、肝消失マーカーであるオキサシリンの障害群における局所モーメント特性値は、それぞれが正常群と比較して有意に大きな値であった。 $F_H$  は正常群では約 50% であったが、障害により約 80% に上昇し、軽障害群と重障害群との間で有意差はなかった。重障害群の  $\bar{t}_H$  及び  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  は、それぞれが軽障害群と比較しても有意に大きな値であった。

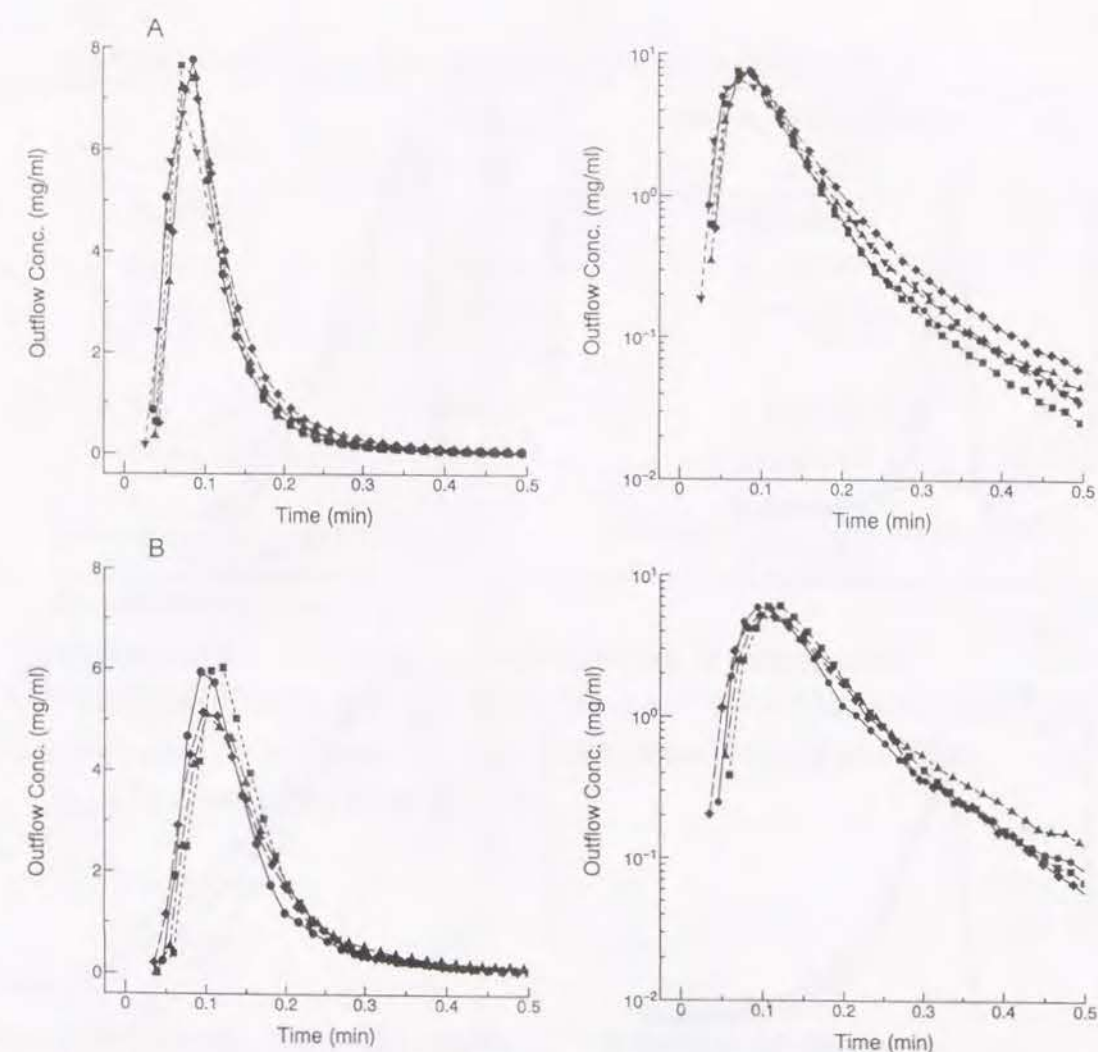


Fig. I-6 Venous perfusate concentration vs. time plots of BSA in (A) control group and (B) heavily  $CCl_4$ -intoxicated group. The left panel is normal scale and the right panel is semi-logarithmic scale. (Dose=9.8mg)



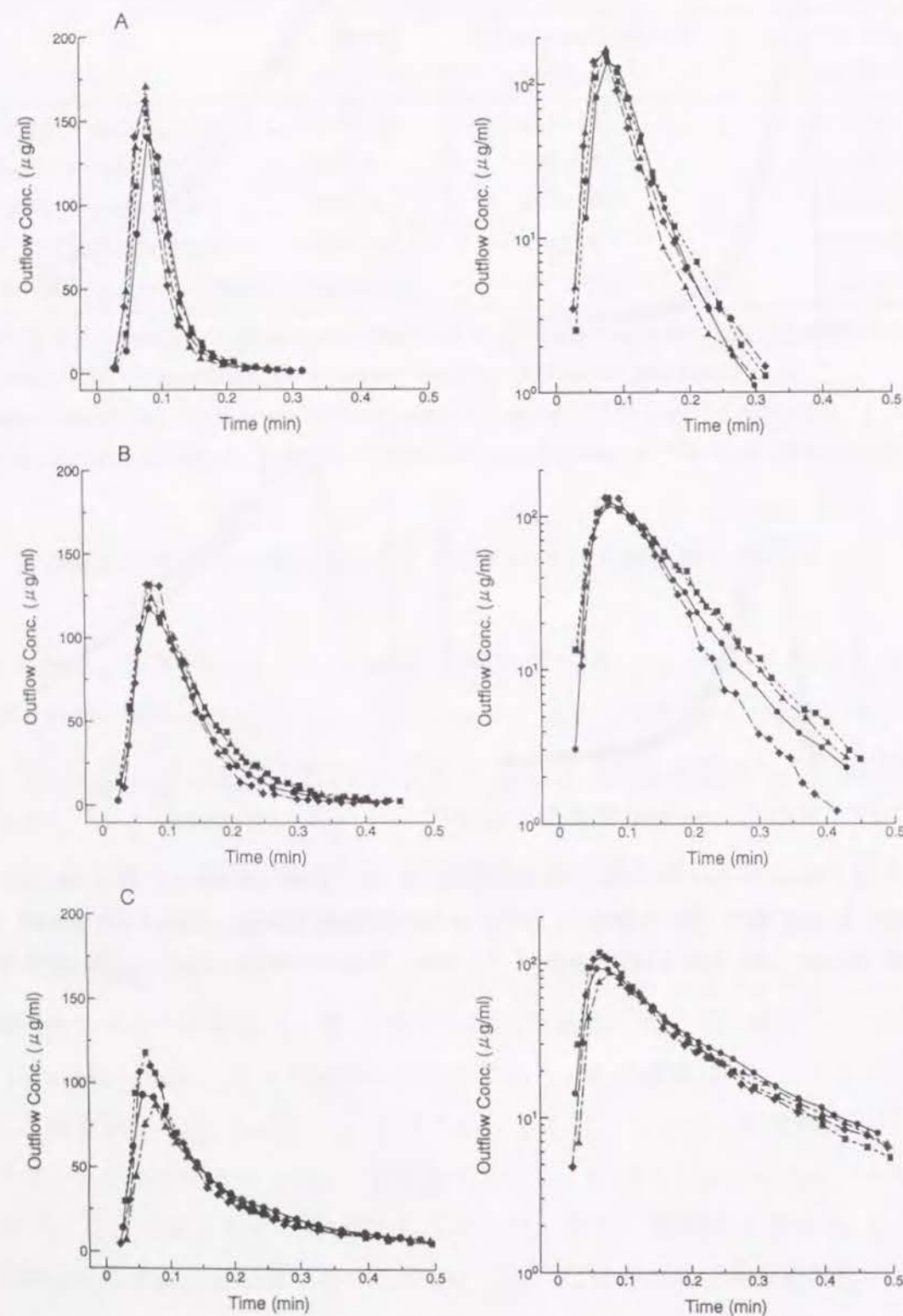


Fig. I-7 Venous perfusate concentration vs. time plots of oxacillin in (A) control group, (B) lightly  $\text{CCl}_4$ -intoxicated group, and (C) heavily  $\text{CCl}_4$ -intoxicated group. The left panel is normal scale and the right panel is semi-logarithmic scale. (Dose=0.306mg)

Table I-4

Moment parameters of BSA calculated by numerical integration

	Control liver (n=5)	Heavily intoxicated liver (n=4)
$F_H$ (%)	99.7±3.0	100.2±1.7
$\bar{t}_H$ (sec)	6.98±0.44	9.69±0.55 *
$\sigma^2/\bar{t}_H^2$	0.380±0.029	0.396±0.061
$V_B$ (ml)	1.48±0.08 <sup>a</sup>	2.05±0.11 *
% $V_B$ to liver	15.5	20.7±1.4 *
$V_H$ (ml)	1.74±0.11	2.40±0.13 *
% $V_H$ to liver	18.2±0.3	24.2±1.6 *

Results are reported as mean±s.d.

Numbers in parentheses represent the number of experiments.

\* Significantly different from control (normal) liver at 5% level of ANOVA.

<sup>a</sup> Estimated by wet liver weight (g) x 0.155 from the reference (67).

$V_H$  are calculated by equation (I-12).

Table I-5

Moment parameters of oxacillin calculated by numerical integration

	Control liver (n=4)	Lightly intoxicated liver (n=4)	Heavily intoxicated liver (n=4)
$F_H$ (%)	48.3±1.3	77.7±6.9 *	77.2±3.1 *
$\bar{t}_H$ (sec)	5.96±0.34	8.50±0.5 *	11.7±0.6 **,*
$\sigma^2/\bar{t}_H^2$	0.227±0.049	0.405±0.039 *	0.691±0.071 **,*
$E_H$ (%)	51.7±1.3	22.3±6.9 *	22.8±3.1 *
$R_N$	0.729±0.027	0.256±0.089 *	0.259±0.040 *
$V_H$ (ml)	1.49±0.09	2.14±0.13 *	2.94±0.18 **,*
% $V_H$ to liver	14.9±1.5	22.6±1.5 *	31.0±2.3 **,*

Results are reported as mean±s.d.

Numbers in parentheses represent the number of experiments.

\* Significantly different from control (normal) liver at 5% level of ANOVA.

\*\* Significantly different from lightly intoxicated liver at 5% level of ANOVA.

$R_N$  and  $V_H$  are calculated by equation (I-11) and (I-12), respectively.



## 2-5. 急性肝障害による BSA の肝移行動態の変動

Table I-4 に示したように、障害群における BSA の  $\bar{t}_H$  は、正常群と比較して有意に大きな値であった。CCl<sub>4</sub> 肝障害時におけるこの  $\bar{t}_H$  の増加は、 $V_B$  あるいは  $(1+k')$  の増大によることが (I-9) 式から理解できる。血液部マーカーとして選択される BSA と肝組織との相互作用は、通常では小さいことが報告されている (27, 65, 66)。従って、BSA の  $(1+k')$  は 1 に近く、CCl<sub>4</sub> 肝障害によって変動しにくいことが予測される。正常時のラット肝重量に対する肝血液部体積  $V_B$  の割合は、顕微鏡を用いた研究から 15.5 % と推定されているので (67)、正常群における見かけの分布容積  $V_H$  を  $V_B$  で除することにより、BSA の  $(1+k')$  は 1.17 と算出された。これから、CCl<sub>4</sub> 肝障害により BSA の  $(1+k')$  が変動しないと仮定すると、障害群における  $V_B$  % は 20.7 % と推定され、肝血液部の増大が示唆された。肝臓病の初期には肝小葉間静脈の終末部が、正常時と比較して約 1.6 倍にまで大きくなることが観測されている (47)。また、肝血流の不均一性が急性障害肝で増大することが、肝臓の血行動態の観点より報告されている (47)。肝実質細胞が壊死をおこすと、血管内皮細胞の内層が大きく変化し、Disse 腔が膨張して、機能的肝血管内短絡が発生する (47, 68)。これらの知見は、肝血液部体積が肝障害によって増大することを示しており、今回の実験結果を支持するものである。

一方、(I-10) 式から理解されるように、 $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  は二つの項、即ち拡散に關与する第一項と非平衡分配に關する第二項により構成されている。BSA の  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  は、正常群と障害群との間で有意差はなかった。これは、BSA の肝組織への非平衡分配が非常に小さいことを考慮すると、肝血液部における拡散の程度が CCl<sub>4</sub> 急性肝障害により変化しないことを示唆している。以上の考察により、血液部マーカーである BSA の肝局所モーメント特性値の変動から、急性肝障害時における肝血液部体積の増大が観測され、血管内での血流方向の拡散は変わらないと結論された。

## 2-6. 急性肝障害によるオキサシリンの肝移行動態の変動

Table I-5 に示したように、オキサシリンの障害群における局所モーメント特性値は、それぞれが正常群と比較して有意に大きな値であった。 $F_H$  は、軽障害群と重障害群の間では有意差がなかったのに対して、 $\bar{t}_H$  及び  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  は、肝臓の障害度が上昇するに伴い、有意に大きな値となった。障害度に関わりなく、肝抽出率  $E_H$  は約 50% から約

20% へと、efficiency number  $R_N$  も 0.73 から 0.26 へと減少し、CCl<sub>4</sub> 肝障害による消失能の低下が示された。Table I-4 に示した BSA の肝血液部体積  $V_B$  の値を用いると、(I-9) 式と  $V_H$  の値から正常群と重障害群におけるオキサシリンの  $(1+k')$  はそれぞれ 0.96、1.50 と推定され、CCl<sub>4</sub> 肝障害による組織への分布の増加が示された。BSA のデータ解析からは、血管内での拡散が CCl<sub>4</sub> 肝障害によりほとんど影響を受けないことも示されているので、オキサシリンの  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  の顕著な増加は、(I-10) 式から非平衡分布過程の増加によるものと推察される。ラットの体内において、オキサシリンは、5位の水酸化及びβラクタム環の開裂により速やかに代謝されることが報告されている (69)。CCl<sub>4</sub> 肝障害に伴うオキサシリンの肝局所モーメント特性値の変動は、肝臓内の代謝経路の一部が障害の発生によって阻害され、オキサシリンの消失過程の一部が分布過程へと変換したことを示唆している。CCl<sub>4</sub> 急性障害肝では、肝実質細胞の破壊や自己消化が原因となり、細胞内構成要素の逸脱が起こりやすい (57, 59)。従って、細胞内において薬物が結合する細胞内器官や酵素蛋白が減少するので (7, 70)、肝障害時にはオキサシリンの組織結合や酵素代謝が低下するものと予測される。

## 2-7. モデル依存的解析法と局所モーメント解析法の関係

血液部と肝組織との間の薬物移行が、瞬時平衡、即ち組織への薬物分布が血流律速である時、肝静脈側への溶出濃度の時間推移は平衡拡散モデル (one-compartment dispersion model) により忠実に表現される (71)。一方、薬物移行が瞬時平衡とはならない、即ち組織への薬物分布が膜透過律速である時、溶出濃度の時間推移は非平衡拡散モデル (two-compartment dispersion) により表現される (30, 40, 71)。Fig. I-6 及び Fig. I-7 に示されるように、正常群であれ障害群であれ、BSA 及びオキサシリンの溶出濃度推移はほとんどが二相性で減衰するので、非平衡拡散モデルによる解析が妥当と考えられる。しかしながら、dispersion モデル (28, 30) や distributed モデル (45) などのモデル解析法を利用する際には高度で煩雑な当てはめ計算を要するために、障害による肝臓の形態や機能における変化と臓器レベルにおける薬物局所動態との関連性について研究された報告例はほとんどなかった。局所モーメント解析に基づいた本法により、上述した組織への薬物移行における律速過程のいかなを問わず、簡便な積分計算を用いるだけで薬物の肝移行動態特性をモデル非依存的に評価することが可能となった。



### 第3節 肝臓灌流系における薬物代謝過程の局所モーメント解析

肝臓での薬物代謝は、親化合物の消失による薬理作用の減少や活性代謝物の生成による毒性発現などに結びつくことから重要視されている。従来、代謝実験として臓器ホモジナイズや肝ミクロームが用いられているが、肝臓が本来有する構造的機能を見逃した実験系であるために、得られた結果は定性的である場合が多く、臓器全体の代謝活性へとスケールアップする際には注意を要する場合が多い。そこで本節では、臓器灌流系で薬物代謝を評価できる速度論的方法を考案した。

アロプリノールとオキシプリノールはキサンチン酸化酵素に対する強力な阻害剤として高尿酸血症や痛風の治療薬として臨床で汎用されている(72-75)。キサンチン酸化酵素はヒポキサンチンからキサンチン、キサンチンから尿酸への生成を触媒する。肝臓においてアロプリノールはキサンチン酸化酵素によりオキシプリノールへと代謝される(76, 77)。アロプリノールとオキシプリノールの主たる作用部位が肝臓であるにもかかわらず、これらの肝局所動態に関する報告例はほとんどない(78)。本節では、アロプリノールとオキシプリノールの肝臓における局所動態を詳細に評価することを目的として、瞬時投与による肝一回通過実験を用いてアロプリノールからオキシプリノールへの代謝過程の速度論的評価を局所モーメント解析によって行った。臓器灌流系における代謝速度論の解析には、第1節で記述した well-stirred モデル、parallel-tube モデル及び dispersion モデルが適用されているが、定常状態における親化合物の消失速度と主代謝物の生成速度の推定に限定されている(79, 80)。本節では、薬物瞬時投与後の静脈側溶出濃度の時間推移から直接、代謝物の生成挙動を速度論的に解析するためにモデル非依存的解析法であるモーメント理論を適用した。

#### 3-1. 局所モーメント解析に基づく局所薬物代謝過程の評価法

肝局所モーメント特性値は、第1節と同様にモデル非依存的の方法に従い、実測点に対しては線形台形公式を適用し、また terminal phase に対しては最小二乗法により一次速度式に当てはめて無限時間まで外挿した値を算出した。

一方、親化合物から変換された代謝物の肝静脈側溶出濃度推移、即ちアロプリノール投与後の静脈側に出現するオキシプリノールの濃度推移については、肝局所モーメントをモデル非依存的に以下のように定義できる。

$$F_{H,pre \rightarrow met} = \frac{\int_0^{\infty} C_{pre \rightarrow met}(t) dt}{M/Q} = (1 - F_{H,pre}) \cdot f_m \cdot F_{H,met} \quad (I-17)$$

$$\bar{t}_{H,pre \rightarrow met} = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot C_{pre \rightarrow met}(t) dt}{\int_0^{\infty} C_{pre \rightarrow met}(t) dt} = \bar{t}_{H,pre} + \bar{t}_m + \bar{t}_{H,met} \quad (I-18)$$

ここで  $F_{H,pre \rightarrow met}$  と  $\bar{t}_{H,pre \rightarrow met}$  は、親化合物から変換された代謝物の肝静脈側への回収率及び平均通過時間をそれぞれ表す。 $M$  は親化合物の投与量、 $C_{pre \rightarrow met}$  は親化合物から変換された代謝物の肝静脈側溶出濃度推移、 $F_{H,pre}$  は親化合物の肝通過率、 $f_m$  は肝臓内で消失した親化合物の代謝物への変換率、 $F_{H,met}$  は肝臓内で生成された代謝物の肝静脈側への見かけの回収率である(80)。また、 $\bar{t}_{H,pre}$  は親化合物の平均肝通過時間、 $\bar{t}_m$  は親化合物から代謝物への平均変換時間、 $\bar{t}_{H,met}$  は肝臓内で生成された代謝物の見かけの平均肝通過時間である。(I-17)式及び(I-18)式を適用することにより、代謝物の肝臓内挙動についても局所モーメント解析に基づいて評価することが可能となった。

#### 3-2. 肝臓灌流実験法及び灌流液中薬物濃度定量法

動物実験は第1節と同様に Wistar 系雄性ラットを用いてペントバルビタール麻酔下で開腹し、Mortimore 法に基づく *in situ* single-pass 系肝灌流実験を行った。ラットを低投与量と高投与量との2群に分け、アロプリノール(Sigma 社)及びオキシプリノール(Sigma 社)の投与量をそれぞれ 0.1 mg/ml と 1.0 mg/ml に設定した。アロプリノール(0.1 mg/ml, 0.735 mM)あるいはオキシプリノール(0.1 mg/ml, 0.657 mM)を溶解させた灌流液 0.250 ml を六方バルブインジェクタを用いて門脈に瞬時投与し、肝静脈側より流出する溶出液を約 1 秒ごとに 2 分間採取した。アロプリノールとオキシプリノールの灌流液中濃度は、HPLC 法により同時定量した。HPLC システム(LC-6A、島津製作所)は、UV detector (SPD-2A、島津製作所)を検出器、Capcell Pak C18(4.6 mm i.d. x 250 mm、資生堂)を固定相として使用した。移動相は、pH 3.65 に調製した 0.02 M のリン酸-カリウム溶液を用いて、流速を 1.0 ml/min とした(81)。検出波長を 254 nm、カラム温度を 40°C に設定した。採取した溶出液の各サンプル 0.1 ml を HPLC に注入した。両薬物の検量線の相関係数は、灌流実験で測定される濃度範囲において 0.999 以上であった。



### 3-3. 肝静脈側溶出濃度の時間推移と肝局所モーメント特性値

Fig. I-8 に、アロプリノールの低投与量群 ( $n=3$ , Fig. I-8A) 及び高投与量群 ( $n=4$ , Fig. I-8B) におけるアロプリノールとオキシプリノールの肝静脈側溶出濃度の時間推移を示した。また Fig. I-9 に、オキシプリノールの低投与量群 ( $n=4$ , Fig. I-9A) 及び高投与量群 ( $n=3$ , Fig. I-9B) におけるオキシプリノールの溶出濃度の時間推移を示した。Fig. I-8 及び Fig. I-9 の左図は通常濃度で、右図は片対数で表示した。アロプリノール投与群では、変換されたオキシプリノールがアロプリノールとほぼ同時に静脈側へと出現した。低投与量群においては、オキシプリノールは常にアロプリノールよりも高濃度で観測されたが、高投与量群では代謝過程に飽和がおこりオキシプリノールは常にアロプリノールよりも低濃度で観測された。また、アロプリノールの溶出曲線の時間推移は投与量の増加に伴って広がり、 $C_{max}$  は上昇し terminal phase の傾きは緩やかになった。一方、オキシプリノール投与群では、オキシプリノールの溶出曲線の時間推移は投与量の増加に伴い線形的に上昇し、広がりや terminal phase の傾きに変化はなかった。

Table I-6 及び Table I-7 に、アロプリノール投与群とオキシプリノール投与群におけるアロプリノール及びオキシプリノールの肝局所モーメント特性値を示した。アロプリノールの  $F_H$  は低投与量群では約 13 % であったが、高投与量群では約 78 % に上昇し、高投与量群の  $\bar{t}_H$  及び  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  は、それぞれが低投与量群と比較して有意に大きな値であった。これは、投与量の増加に伴いアロプリノールからオキシプリノールへの代謝過程が飽和し、アロプリノールの消失の一部が可逆的な非平衡分布に変わったことを意味する。また、アロプリノールから変換されたオキシプリノールの  $F_H$  は、低投与量群では約 84 %、高投与量群では約 18 % であり、アロプリノールと変換されたオキシプリノールとの  $F_H$  の総和は、両投与量群共にほぼ 100 % となった。変換されたオキシプリノールの  $\bar{t}_H$  はアロプリノールと同様に投与量の上昇に伴い増加した。一方、非代謝性薬物であるオキシプリノールの  $F_H$  は、両投与量群ともにほぼ 100 % であった。また、 $\bar{t}_H$  及び  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  には両群間で有意差はなく、投与量依存性を示さなかった。以上の結果より、アロプリノールは肝臓内で速やかにオキシプリノールへと代謝されるが、投与量の増加に伴いこの代謝過程は飽和すること、肝臓内で生成されたオキシプリノールは効率的に血液側へと排出されることが明らかとなった。一方、オキシプリノール自身は元来非代謝性薬物であり、投与量の増加によっても動態特性は変わらず、肝臓では消失しないこと、肝組織への大きな非平衡性の分布を示すことが明らかとなった。

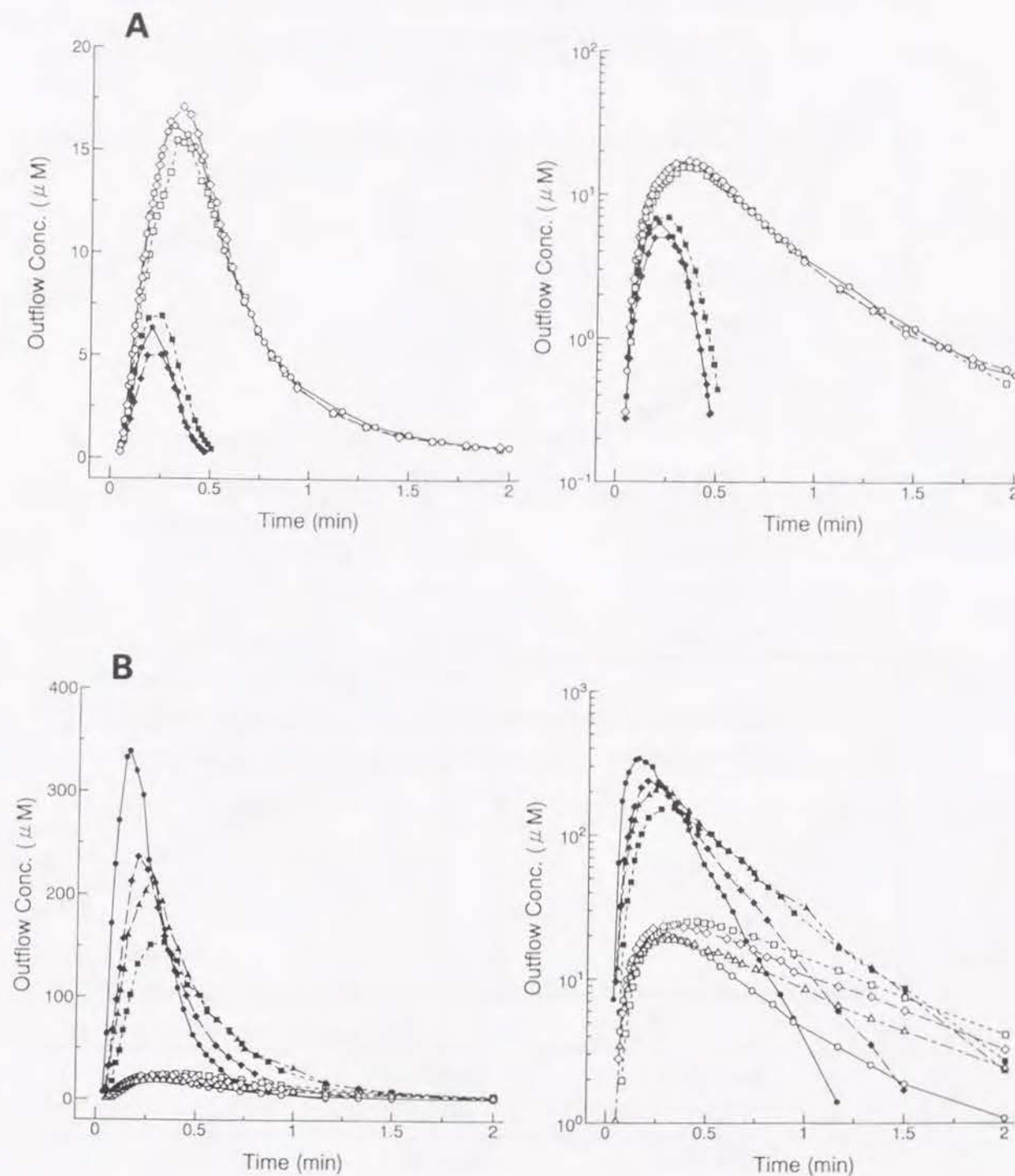


Fig. I-8 Venous perfusate concentration vs. time plots of allopurinol (●) and oxipurinol (○) after allopurinol administration in (A) low dose (dose=25 μg) and (B) high dose (dose=250 μg). The left panel is normal scale and the right panel is semi-logarithmic scale.



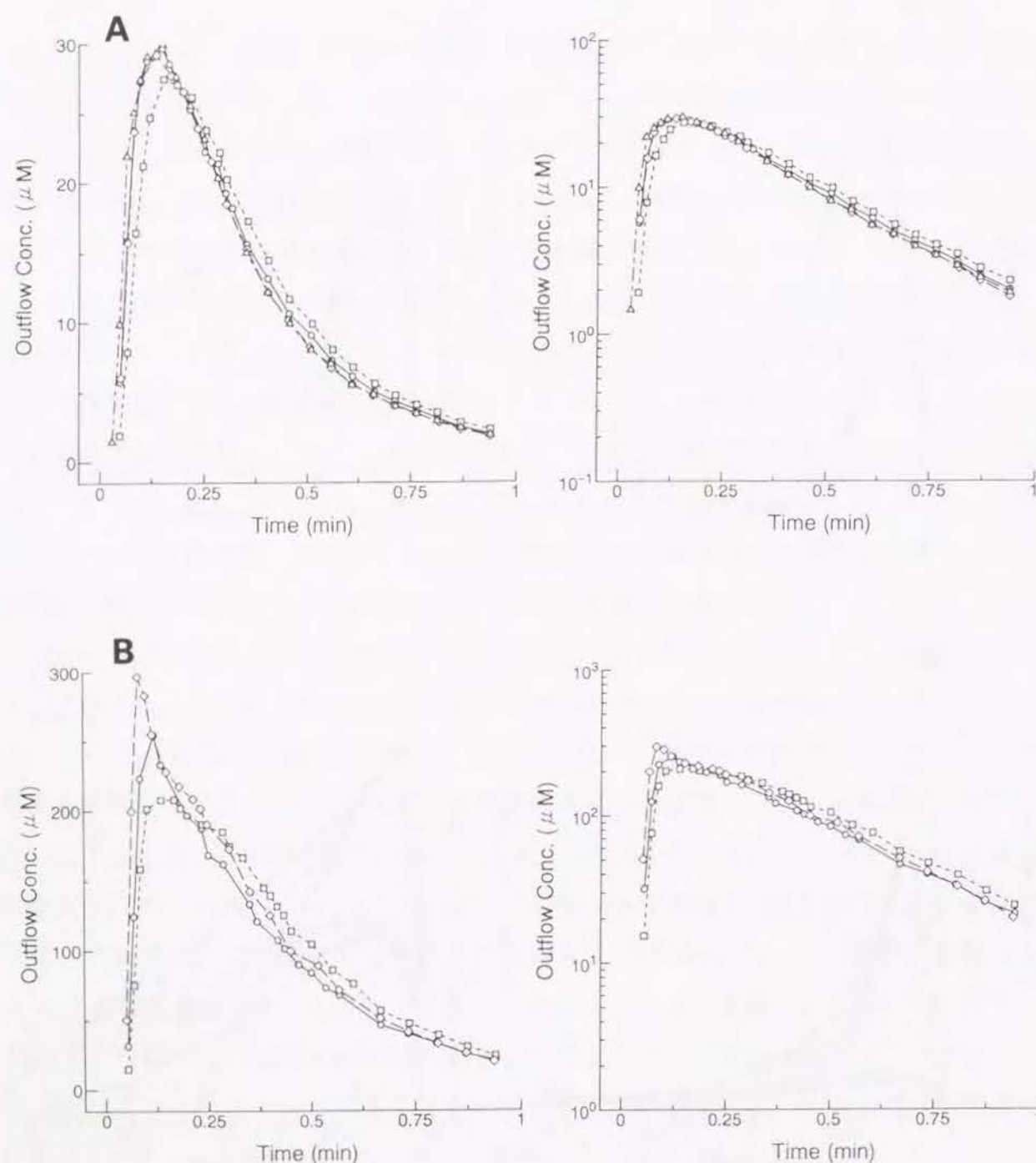


Fig. I-9 Venous perfusate concentration vs. time plots of oxipurinol after oxipurinol administration in (A) low dose (dose=25 μg) and (B) high dose (dose=250 μg). The left panel is normal scale and the right panel is semi-logarithmic scale.

Table I-6

Moment parameters of allopurinol and oxipurinol as metabolite calculated by numerical integration after allopurinol administration

	Low dose (n=3)	High dose (n=4)
Liver weight (g)	8.69±0.51	8.87±0.61
<u>allopurinol</u>		
$F_H$ (%)	12.6±2.7	78.0±7.2 *
$\bar{t}_H$ (sec)	14.5±0.8	25.3±6.4 *
$\sigma^2/\bar{t}_H^2$	0.163±0.013	0.472±0.030 *
<u>oxipurinol</u>		
$F_H$ pre→met (%)	83.9±4.9	18.4±5.7 *
$\bar{t}_H$ pre→met (sec)	38.7±2.1	53.3±9.0 *
$1 - F_H$ pre (%)	87.4±2.7	22.0±7.2 *
$f_m \cdot F_H$ met (%)	95.9±2.9	83.8±2.4 *
$\bar{t}_m + \bar{t}_H$ met (sec)	24.3±1.9	28.0±5.3

Results are reported as mean±s.d.

Numbers in parentheses represent the number of experiments.

\* Significantly different from low dose at 5% level of ANOVA.

Table I-7

Moment parameters of oxipurinol calculated by numerical integration after oxipurinol administration

	Low dose (n=4)	High dose (n=3)
Liver weight (g)	7.88±0.43	8.92±0.20
$F_H$ (%)	102.6±1.7	98.2±0.4
$\bar{t}_H$ (sec)	21.5±1.1	24.4±1.2
$\sigma^2/\bar{t}_H^2$	0.598±0.031	0.647±0.072

Results are reported as mean±s.d.

Numbers in parentheses represent the number of experiments.



### 3-4. 投与量の上昇に伴う代謝過程の変動

肝臓内におけるアロプリノールからオキシプリノールへの代謝変換率  $f_m$  は、オキシプリノール自身の  $F_H$  が 100 % であることから (I-17) 式より、低投与量では 96 %、高投与量では 84 % と算出された。投与量の増加に伴いキサンチン酸化酵素による酸化過程は飽和して、アロプリノールは別の経路によって肝内から消失することが明らかとなった。また、アロプリノールからオキシプリノールへの平均肝代謝時間  $\bar{t}_m$  は、オキシプリノール自身の  $\bar{t}_H$  を考慮すると (I-18) 式から、低投与量では 3 sec、高投与量では 4 sec と算出されほぼ同程度の値であり、アロプリノールからオキシプリノールへの代謝は投与量に依らず非常に速い反応過程であることが明らかとなった。

### 3-5. 考察

キサンチン酸化酵素は、肝臓内では血液側(シヌソイド)膜近傍の細胞質中に局在することが知られている (82, 83)。従って、アロプリノールは血液部から肝組織へ取り込まれた後すぐに細胞質内でキサンチン酸化酵素と接触できる可能性が高い。肝臓内でアロプリノールから代謝されたオキシプリノールが、親化合物であるアロプリノールと比較してほぼ同時に肝静脈側へ出現したのは、アロプリノールからオキシプリノールへの酸化反応が非常に速いことに加えて、血管部近傍におけるキサンチン酸化酵素の局在性も大いに影響していると考えられる。

(I-12) 式から肝臓への見かけの分布容積  $V_H$  を求めると、アロプリノールの  $V_H$  は低投与量では肝重量の約 42%、高投与量では約 71% と算出された。一方、オキシプリノールの  $V_H$  は両投与量共に約 68% と算出された。両薬物の  $V_H$  は共に、第 2 節で述べた肝血液部体積(約 15.5%)と比較してかなり大きな値を示し、両薬物は肝組織にかなり分布することが明らかとなった。これより、灌流液中から肝組織内へと消失したアロプリノールが肝細胞内のキサンチン酸化酵素によりオキシプリノールへと代謝され、生成したオキシプリノールは細胞質などの肝細胞内へ十分に分布し、あるいはキサンチン酸化酵素と可逆的結合した後に血液部へと排出されることが示唆された。*in vivo* における血中のアロプリノールとオキシプリノールは、主に腎臓からの排泄によって体内から消失することが知られている (76, 77, 84)。これらの知見は、肝臓においてはアロプリノールからオキシプリ

ノールへの代謝反応だけがおこり、両薬物は肝臓では消失しないことを示しており、今回の実験結果を支持するものである。

肝臓灌流実験における薬物代謝速度論は、最も基本的なモデルである well-stirred モデル または parallel tube モデルを用いて、主に定速注入による定常状態解析法 (85, 86) や、再循環入力によるコンパートメント解析法 (85, 87) によって研究されてきた。しかし、これらのモデル依存的解析法は、複数の過程が組合わさったハイブリッドパラメータを推定する方法論であり、single-pass 系の肝灌流実験における薬物瞬時投与後の親化合物と代謝物の溶出濃度推移を正確に表現することは不可能で、これらの速度論的評価に適用されたことはなかった。親化合物を瞬時投与後に肝静脈側へと溶出される代謝物の濃度推移には、多段階の複雑な逐次過程に関する豊富な情報が含まれている。即ち、親化合物の肝組織への取り込み過程、親化合物と代謝酵素との結合、代謝物の生成、代謝物の酵素からの解離、代謝物の肝臓内における消失と分布である。

本節では、ラット肝臓における瞬時投与後のアロプリノールからオキシプリノールへの局所代謝過程を、(I-14) 式及び (I-15) 式に示した局所モーメント解析に基づいて、量と速度の観点からモデル非依存的に簡便に評価することができた。上述したように、代謝物の速度論は一連の複雑な過程を含んでいるが、局所モーメント特性値はモデル解析に依存しないパラメータによって局所動態を評価できる利点を有している。一方、代謝過程を組み込んだ非平衡拡散モデルに基づく非線型最小二乗法を用いた当てはめ計算によって、single-pass 系肝灌流実験における瞬時投与後の親薬物と代謝物の溶出濃度推移を詳細に解析することも確かに有用であり、今後の発展が期待される。



## 第II章 肝灌流実験系における薬物の細胞内移動と胆汁中排泄過程の局所モーメント解析

胆汁中排泄の時間推移は血中濃度推移と比べて明確に遅れることがいくつかの薬物について知られている。この遅延現象を臓器系で解析することを試みた。まず、血管側と胆管側との間の肝実質細胞をひとつの層として捉え、薬物はその層中を濃度勾配に従って拡散すると考えた肝実質細胞内拡散モデルを構築した。次に、このモデルに基づいて薬物排泄を表すラプラス次元の式を誘導して、高速ラプラス逆変換による非線型最小二乗計算と組み合わせた肝胆系輸送解析法を確立した。推定されたモデルパラメータから肝細胞内移動、胆管膜透過、胆管腔通過の各過程に要する平均通過時間を算出し、薬物の肝胆系輸送を三つの移行過程により分離評価した。さらに、代謝過程を含んだ肝胆系輸送については、胆汁中排泄の局所モーメント値によりデコンボリューション計算するモデル非依存的解析法を構築した。

### 第1節 新規肝細胞内移動拡散モデルに基づく薬物の肝胆系輸送過程の分離評価

第I章で記述したとおり、肝灌流実験の静脈側薬物溶出データに関しては、様々なモデルを用いた詳細な解析が行われている。一方、薬物の胆汁中排泄の時間経過は、血中（灌流液中）濃度変化と比較して時間的に遅れることが、*in vivo* 排泄実験(88-90)及び *in situ* 肝灌流実験(91-93)から知られている。この遅延現象は、薬物の肝血液部から胆汁中への輸送におけるいくつかの速度論的過程を反映していると考えられるが、この各輸送過程を臓器レベルで詳細に解析した研究例はほとんどない。薬物の肝胆系輸送は、いくつかの段階から成り立つ。即ち、肝 sinusoid から Disse 腔及び sinusoid 膜を透過した肝細胞への取り込み、肝細胞内を通過する胆管腔膜方向への移動拡散、肝細胞内から毛細胆管への排泄、毛細胆管内を通過して総胆管出口への移動である。Tipping と Ketterer は、定常状態における薬物の肝細胞内輸送と代謝変換を同時に評価するために、薬物が Fick の法則に従って細胞内を移動する輸送モデルを提案した(94)。一方、Stock らは、肝細胞内における蛍光マーカー物質(fluorescein isothiocyanate-dextran)の濃度勾配をビデオスコープにより直接測定し、拡散式から誘導された無限級数式を用いて有効

拡散係数を推定した(95)。さらに Sathirakul らは、*in vivo* 動態実験における薬物のグローバルな胆汁排泄を表現できる生理学的モデルを構築し、肝機能診断用色素の細胞内拡散を推定している(96)。本節では、肝細胞内を通過して sinusoid 側から胆管側へと薬物が移動する現象を、非定常状態において定量的に評価できる新規肝細胞内移動拡散モデルの構築を目的とした。提案した数学モデルは二次偏微分方程式により記述され、誘導される解析解はラプラス次元の式で与えられるため、第I章で述べた高速ラプラス逆変換(FILT)を用いて時間次元の数値解を得た。対象薬物としては、セファロスポリン系抗生物質であるセフィキシムとセフピラミドを選んだ。両薬物は、ラットの肝臓内に取り込まれてから代謝されずに未変化体のまま選択的に胆汁中に排泄されることがラットを用いた *in vivo* 動態実験から確認されており、今回のモデル薬物として適当である(97-100)。著者は、ラットを用いた肝灌流実験において、薬物の静脈側溶出濃度推移と胆汁排泄量推移を同時に測定し、肝細胞内拡散過程を考慮した新規モデルに基づき解析し、肝局所における薬物の血液中から肝細胞への取り込み過程、肝細胞内移動過程および胆汁排泄過程を速度論的に分離評価することを試みた。さらに、この解析法により得られる情報の有用性についても考察した。また、灌流液中に抱合型胆汁酸であるタウロコール酸を加えて胆汁流量を増加させた時のセフィキシムの肝局所動態に及ぼす影響についても検討を加えた。

#### 1-1. 肝細胞内移動拡散モデル

薬物分子は、肝血液部から肝細胞へと取り込まれた後、sinusoid 側から胆管腔側へと濃度勾配に従った拡散により主に細胞質内を移動し、胆管腔膜を透過して胆汁中へと排泄された後、毛細胆管内を移動し総胆管の出口に到達すると考えられる。Fig. II-1 に、この肝胆系輸送過程を表現する肝細胞内移動拡散モデルの概念図を示した。このモデルでは肝臓の生理学的な構造を考慮し、sinusoid 側膜と胆管腔側膜との間の肝実質細胞を平均厚  $L$ 、断面積  $A_H$  の単層として捉え、薬物が血管側から胆管側へと見かけの拡散係数  $D_{app}$  により層内を移動するとした。入力関数  $h_1(t)$  ( $\mu\text{g}/\text{min}$ ) は、血液部と肝細胞との境界における薬物の取り込み速度を表す。肝細胞と毛細胆管との境界における薬物の排出は、排泄クリアランス  $CL_{bm}$  によって一次速度過程で表現されるとした。同様の拡散モデルが、薬物の経皮吸収を理論的に考察するために適用されている(101, 102)。薬物が肝細胞内を



拡散するとき、非結合型・細胞質内可溶性蛋白質との結合型・オルガネラとの結合型の3種類の分子型で存在することが予測される。オルガネラとの結合型の細胞内拡散は無視でき(103)、可溶性蛋白質との結合型の拡散係数は、蛋白質自身の拡散係数に等しくなると考えられる(94)。細胞内での薬物と細胞内蛋白質及びオルガネラとの結合速度や解離速度は、拡散による移動速度と比較して非常に速いために、3種類の薬物分子型は平衡関係にあると仮定できる(94)。シヌソイド側膜から胆管腔側膜の方向へと濃度勾配が形成されて薬物が拡散により移動すると考え、薬物の肝胆系輸送を表現するのに Fick の法則に従った一次元の移動拡散モデルを適用した(94-96)。

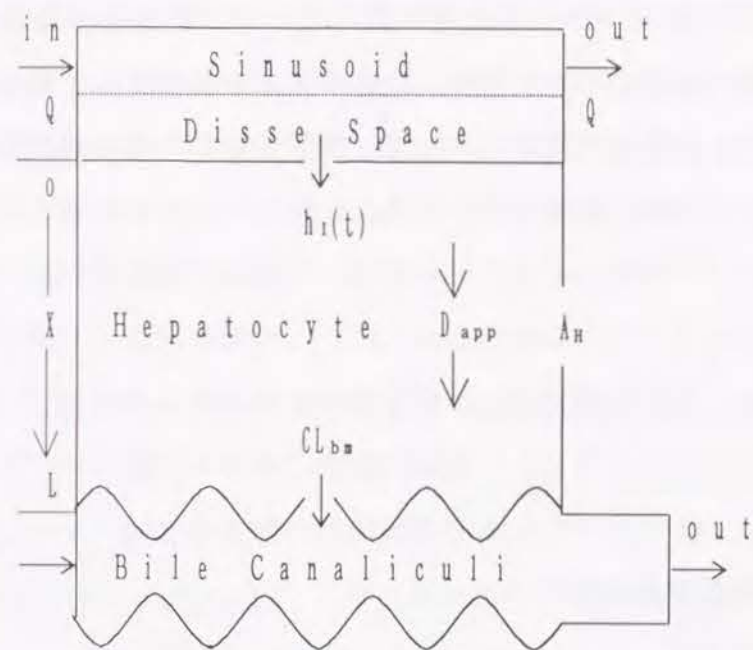


Fig. II-1 Concept of the hepatocellular diffusion model.  $h_I(t)$ : Uptake (input) transfer rate function at sinusoidal membrane;  $D_{app}$ : apparent diffusion coefficient in hepatocytes;  $CL_{bm}$ : Excretion clearance at bile canaliculi;  $L$ : Averaged thickness of mono layer made of a hepatocyte;  $A_H$ : cross-sectional area for penetration across a hepatocyte.

肝細胞内における拡散過程は、Fick の第 2 式に従った(II-1)式で表現される。

$$\frac{\partial C_H(t, x)}{\partial t} = D_{app} \frac{\partial^2 C_H(t, x)}{\partial x^2} \quad (II-1)$$

ここで  $C_H(t, x)$  は肝細胞内における薬物濃度である。(II-1)式は、以下の(II-2)式に示

す初期条件及び境界条件に従ってラプラス変換により解くことができる。

$$\left\{ \begin{array}{l} C_H(0, x) = 0 \\ D_{app} \cdot A_H \frac{\partial C_H(t, 0)}{\partial x} = -F_{hbt} \cdot h_I(t) \\ D_{app} \cdot A_H \frac{\partial C_H(t, L)}{\partial x} = -CL_{bm} \cdot C_H(t, L) \end{array} \right. \quad (II-2)$$

ここで、 $A_H$  は薬物が透過する肝細胞の断面積、 $CL_{bm}$  は胆管腔膜における排泄クリアランス、 $F_{hbt}$  は肝胆系輸送率、即ち肝内へ取り込まれた薬物が胆汁中へ排泄される割合、 $h_I(t)$  はシヌソイド膜における取り込み速度をそれぞれ表す。灌流液速度(約 16ml/min)は、胆汁流量(約 4-10  $\mu$ l/min)と比較して非常に速く(91-93)、肝静脈側への溶出濃度推移の平均通過時間は、胆汁排泄経過の平均通過時間と比較するとかなり短い。これらから、灌流液中の薬物が肝細胞と接触できる時間は、肝細胞内における拡散及び胆汁中への排泄と比較すると非常に短いと考えられるため、 $h_I(t)$  はパルス関数と仮定できる。

$$h_I(t) = M \cdot E_H \cdot \delta(t) \quad (II-3)$$

ここで、 $E_H$  は肝抽出率、 $F_H$  は肝通過率、 $M$  は投与量である。(II-1)式のラプラス変換形は(II-4)式で与えられる。

$$s \cdot \tilde{C}_H(s, x) = D_{app} \frac{d^2 \tilde{C}_H(s, x)}{dx^2} \quad (II-4)$$

(II-4)式を(II-2)式の初期条件及び境界条件に従って解くと、Guy と Hadgraft と同様に(II-5)式が得られる。

$$\tilde{C}_H(s, L) = \frac{1}{A_H \cdot L} \cdot \frac{F_{hbt} \cdot \tilde{h}_I(s)}{\sqrt{s \cdot k_{dif}} \cdot \sinh(\sqrt{s/k_{dif}}) + k_{bmc} \cdot \cosh(\sqrt{s/k_{dif}})} \quad (II-5)$$

ここで、 $k_{dif} (=D_{app}/L^2)$  はみかけの拡散係数を拡散層の厚さの二乗で除した肝細胞内拡



散速度定数、 $k_{bmc}$  ( $=CL_{bm}/(A_H L)$ ) は胆管腔膜の透過クリアランスを断面積と拡散層の厚さ  
とで除した胆管腔膜の透過速度定数をそれぞれ表す。 $C_H(t, L)$  と胆汁排泄速度  
 $dX_b(t)/dt$  との間には次の関係式がある。

$$\frac{dX_b(t)}{dt} = CL_{bm} \cdot C_H(t, L) \quad (II-6)$$

(II-6)式のラプラス変換形に、(II-5)式の  $\tilde{C}_H(s, L)$  を代入すると以下の(II-7)式が得ら  
れる。

$$\tilde{X}_b(s) = \frac{k_{bmc}}{s} \cdot \frac{F_{hbt} \cdot \tilde{h}_I(s)}{\sqrt{s \cdot k_{dif}} \cdot \sinh(\sqrt{s/k_{dif}}) + k_{bmc} \cdot \cosh(\sqrt{s/k_{dif}})} \quad (II-7)$$

灌流実験において実際に測定される排泄の時間経過は、毛細胆管から総胆管出口までの通  
過時間  $\bar{t}_{can}$  の分だけ遅れるとすると、実際の累積排泄量推移を表すラプラス変換形  
 $\tilde{X}_{b,obs}(s)$  は以下の(II-8)式によって与えられる。

$$\tilde{X}_{b,obs}(s) = \frac{k_{bmc}}{s} \cdot \frac{F_{hbt} \cdot \tilde{h}_I(s) \cdot \exp(-\bar{t}_{can} \cdot s)}{\sqrt{s \cdot k_{dif}} \cdot \sinh(\sqrt{s/k_{dif}}) + k_{bmc} \cdot \cosh(\sqrt{s/k_{dif}})} \quad (II-8)$$

実際の胆汁排泄速度  $dX_{b,obs}(t)/dt$  の変換形は、 $s \cdot \tilde{X}_{b,obs}(s)$  により与えられる。

(II-8)式を時間次元の式に逆変換して解析解を得ることは困難であるが、ラプラス変換形  
の式と統計学的モーメントとの関係を用いれば、(II-8)式から排泄推移の局所モーメント  
特性値を計算できる(37)。胆汁への回収率  $F_{bile}$  及び平均通過時間  $\bar{t}_{bile}$  は以下の(II-9)  
式及び(II-10)式により誘導される。

$$F_{bile} = \lim_{s \rightarrow 0} \frac{s \cdot \tilde{X}_{b,obs}(s)}{M} = F_{hbt} \cdot E_H \quad (II-9)$$

$$\bar{t}_{bile} = \lim_{s \rightarrow 0} \frac{-d}{ds} \ln s \cdot \tilde{X}_{b,obs}(s) = \frac{1}{2 \cdot k_{dif}} + \frac{1}{k_{bmc}} + \bar{t}_{can} = \bar{t}_{dif} + \bar{t}_{bmc} + \bar{t}_{can} \quad (II-10)$$

ここで、 $\bar{t}_{dif}(=1/2k_{dif})$  は肝細胞内の拡散輸送に対応する平均通過時間を表し、一方  
 $\bar{t}_{bmc}(=1/k_{bmc})$  は胆管腔膜の透過に対応する平均通過時間を表す。(II-9)式は、薬物の  
胆汁排泄率が血液部から肝内への消失率と肝内から胆汁中への移行率との積から成ること  
を示している。また、(II-10)式は、薬物が血液部から細胞内を移動し胆汁排泄されるま  
での平均胆汁排泄時間  $\bar{t}_{bile}$  が 3 つの項から成ることを示している。即ち、第 1 項は肝  
細胞内の拡散に関する項 ( $\bar{t}_{dif}$ )、第 2 項は胆管腔膜を透過する排出に関する項 ( $\bar{t}_{bmc}$ )、  
そして第 3 項は毛細胆管から総胆管出口までの移動に関する項 ( $\bar{t}_{pas}$ ) である。

## 1-2. ラット肝臓灌流実験法及び灌流液中薬物定量法

ラット肝灌流実験は、第 1 章と同様の Mortimore 肝灌流法に基づいて行った。アルブ  
ミン及び赤血球は、灌流液中には加えなかった。灌流液の流速は 16-17 ml/min に設定し、  
回収率は 99 % 以上であった。20 分の安定期間の後、セフィキシム(1.0 mg/ml)あるいは  
セフピラミド(1.0 mg/ml)を溶解させた灌流液 0.245 ml を六方バルブインジェクタを用  
いて、門脈内に挿入したカニューレから肝臓内へ瞬時投与した。肝静脈に挿入したカ  
ニューレから、溶出液を約 1 秒ごとに 1 分間採取し、同時に胆管カニューレ(100 mm  
PE-10, Becton Dickinson 社)から投与直後は 3 分間隔で、以後適宜間隔を広げて 1 時間  
胆汁を採取した。肝臓の活性は、胆汁流量(>4  $\mu$  l/min)により確認した。胆汁量( $\mu$  l)は  
比重を 1 として求めた。胆管カニューレの内容積を胆汁流量で除することにより、薬物  
が胆管カニューレを通過する平均時間を算出した。モデル解析による当てはめ計算を行う  
前に、あらかじめ薬物の排泄データからカニューレの通過時間を差し引いた。一方、カ  
ニューレ内での広がりを出す分散値は無視できるとした。セフィキシムとセフピラミドの  
灌流液中濃度及び胆汁中濃度は、HPLC 法により定量した。HPLC システム(LC-6A、島津製  
作所)は、UV detector (SPD-6A、島津製作所)を検出器、Chemcosorb 5-ODS-H(4.6 mm i.d.  
x 150 mm、ケムコ社)をセフィキシム用固定相、Nucleosil 5C18(4.6 mm i.d. x 150 mm、  
ケムコ社)をセフピラミド用固定相とし、LiChrosorb RP-2(4.6 mm i.d. x 50 mm、メルク  
社)をガードカラムとして使用した。流速を 1.5 ml/min とし、移動相は、灌流液中のセ  
フィキシム濃度測定用としてリン酸緩衝液(pH 3.2、0.02M  $NH_4H_2-H_3PO_4$ )とアセトニトリル  
の混液(89:11 v/v)を、胆汁中濃度測定用としてリン酸緩衝液(pH 2.3、0.02M  $NH_4H_2-$



H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)とアセトニトリルの混液(87:13 v/v)を用いた。セフピラミド用としては、リン酸緩衝液(pH 7.0、1/15 M)とアセトニトリルの混液(85:15 v/v)を用いた。検出波長をセフィキシムでは 290 nm、セフピラミドでは 254 nm とし、カラム温度を 40℃ に設定した。採取した溶出液の各サンプル 0.1 ml 及び胆汁の各サンプルにトリクロロ酢酸(5% w/v) 0.1 ml を加え、攪拌後 5 分間遠心分離し、上清 15 µl を HPLC に注入した。両薬物の検量線の相関係数は、実験条件の濃度範囲において 0.999 以上であった。

### 1-3. 数値計算方法

セフィキシム及びセフピラミドの肝静脈側溶出濃度の時間推移に対する肝局所モーメント特性値  $F_H$ 、 $\bar{t}_H$ 、及び  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  は、第 1 章と同様にモデル非依存的解析法に基づいた定義式である(I-13)～(I-15)式に従い計算した。即ち、実測点に対しては線形台形公式による積分計算を適用し、また terminal phase に対しては最小二乗法により一次速度式に当てはめて無限時間まで外挿した値を算出した。

一方、セフィキシム及びセフピラミドの胆汁中排泄の時間経過に対しては、ラプラス変換形で与えられた(II-8)式に基づき、高速ラプラス逆変換(FILT)を組み込んだ非線形最小二乗法プログラム MULTI(FILT)を用いて京都大学大型計算機センターの大型コンピュータ上で観測データに対してあてはめ計算を行い、モデルパラメータを推定した。得られたパラメータより、(II-10)式に示した 3 つの各移行過程に要する平均通過時間を算出した。また、モデルパラメータより算出された胆汁排泄率及び平均胆汁排泄時間と、第 2 節で述べる以下の(II-11)式及び(II-12)式に従い台形公式より計算した局所モーメント特性値との比較も行った。

$$F_{bile} = \frac{\int_0^\infty \{dX_{b,obs}(t)/dt\}dt}{M} \quad (II-11)$$

$$\bar{t}_{bile} = \frac{\int_0^\infty \{t \cdot dX_{b,obs}(t)/dt\}dt}{\int_0^\infty \{dX_{b,obs}(t)/dt\}dt} \quad (II-12)$$

### 1-4. 肝細胞内移動拡散モデルに基づく薬物肝胆系輸送のシミュレーション

FILT を用いたシミュレーション計算により、肝細胞内拡散モデルの各パラメータが胆汁排泄曲線の形にどのような影響を及ぼすかを考察した。以下に示す全てのシミュレーションは、(II-8)式に基づいて計算した。Fig. II-2 は  $k_{dif}$  の変化、即ち肝細胞内のみかけの拡散係数の変化の影響を示している。拡散係数が減少するにつれ、排泄速度曲線は緩やかになり最大排泄速度は低下し、ピークに達するまでの時間は延長した。また、排泄量については立ち上がりの傾きが小さくなり、最大値に達するまでの時間も延長した。さらに両曲線共に立ち上がりの前に lag time が観測された。Fig. II-3 は  $k_{bmc}$  の変化、即ち胆管腔側膜の透過クリアランスの変化の影響を示している。クリアランスが減少するにつれて、排泄速度曲線は緩やかになり最大排泄速度は低下するが、 $k_{dif}$  の時ほど顕著な変化ではなく、 $k_{dif}$  の時には見られたピークに達するまでの時間の延長や立ち上がりの lag time は観測されなかった。Fig. II-4 の  $F_{hbt}$  の変化については、両曲線共に縦軸方向への増減のみが影響を受けるだけで、時間推移の平均排泄時間は全く変化しない。以上の考察より、各パラメータの変動が及ぼす排泄曲線の特徴的な変化が明らかとなった。

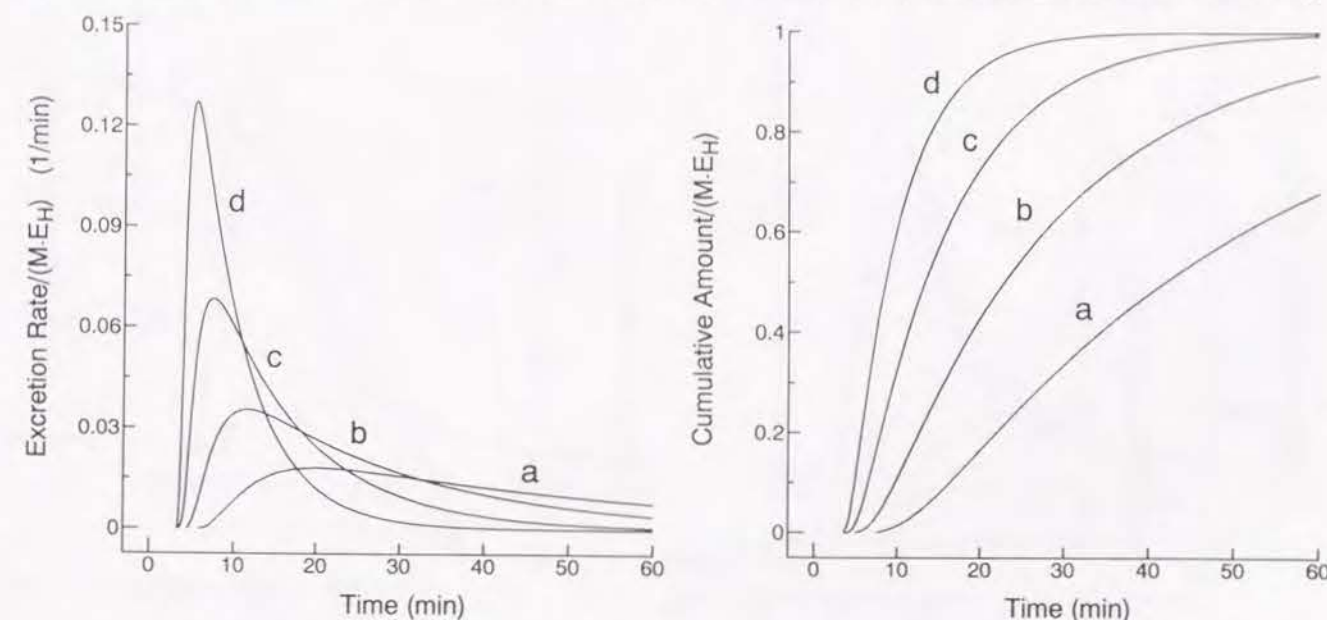


Fig. II-2 Effect of  $k_{dif}$  (or  $D_{app}$ ) on the biliary excretion rate (left panel) and cumulative amount (right panel) profiles.

(a)  $k_{dif}=0.01 \text{ min}^{-1}$ ; (b) 0.02; (c) 0.04; (d) 0.08.  $k_{bmc}=1.0 \text{ min}^{-1}$ ,  $F_{hbt}=1.0$ , and  $\bar{t}_{can}=1.0 \text{ min}$ . Mean transit times are (a) 52.0, (b) 27.0, (c) 14.5, (d) 8.3 min, respectively.



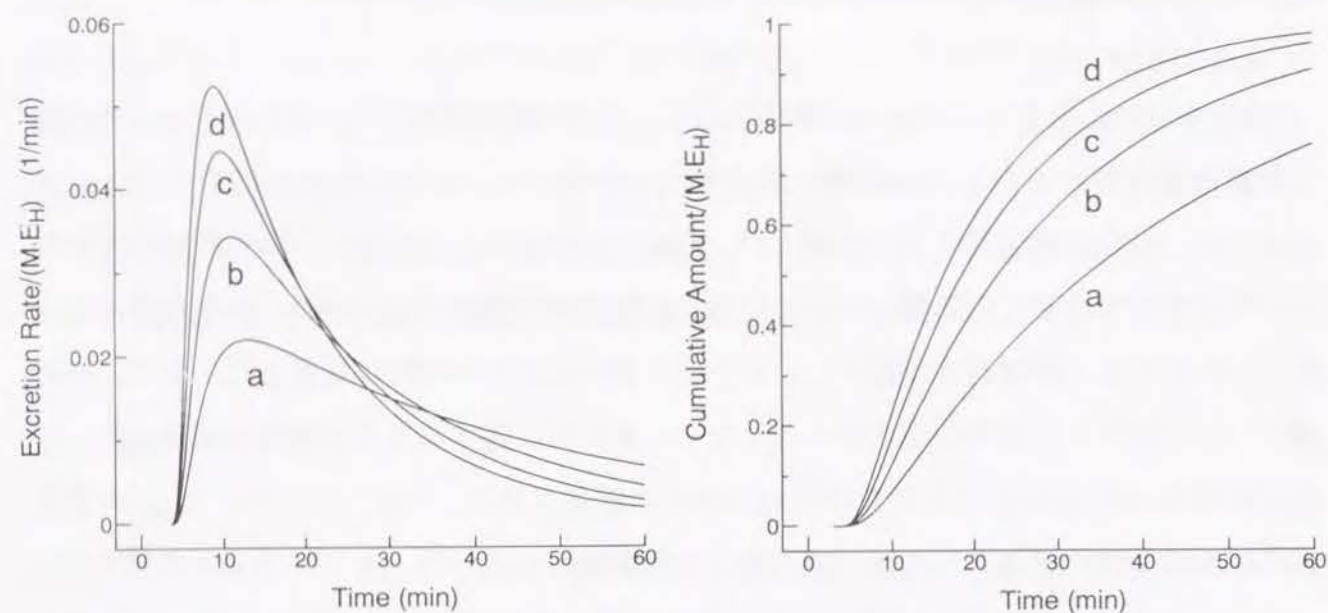


Fig. II-3 Effect of  $k_{bmc}$  (or  $CL_{bm}$ ) on the biliary excretion rate (left panel) and cumulative amount (right panel) profiles.

(a)  $k_{bmc}=0.04 \text{ min}^{-1}$ ; (b) 0.1; (c) 0.25; (d) 1.0.  $k_{dif}=0.03 \text{ min}^{-1}$ ,

$F_{hbt}=1.0$ , and  $t_{can}=1.0 \text{ min}$ . Mean transit times are (a) 42.7, (b) 27.7, (c) 21.7, (d) 18.7 min, respectively.

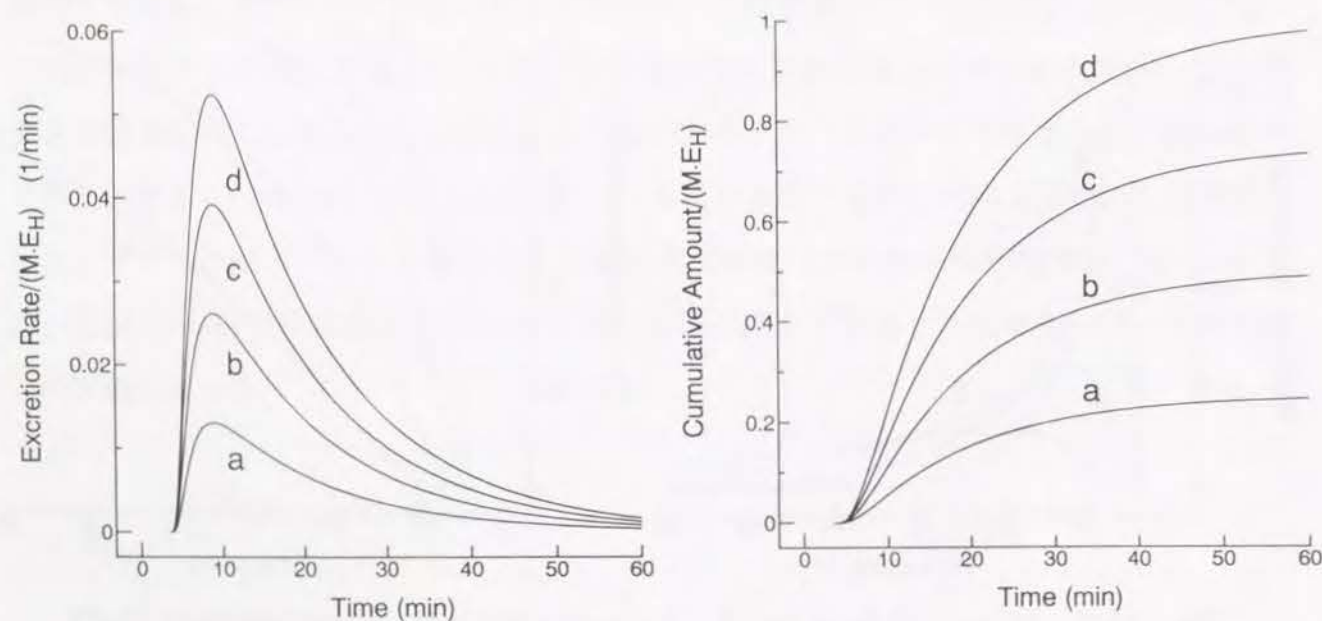


Fig. II-4 Effect of  $F_{hbt}$  on the biliary excretion rate (left panel) and cumulative amount (right panel) profiles. (a)  $F_{hbt}=0.25$ ; (b) 0.5;

(c) 0.75; (d) 1.0.  $k_{dif}=0.03 \text{ min}^{-1}$ ,  $k_{bmc}=1.0 \text{ min}^{-1}$ , and  $t_{can}=1.0 \text{ min}$ .

All mean transit times are 18.7 min.

#### 1-5. 肝静脈側溶出濃度の時間推移と肝局所モーメント特性値

Fig. II-5A 及び Fig. II-5B は、それぞれセフィキシム及びセフピラミドの肝静脈側への溶出濃度の時間推移を表す。また、Table II-1 及び Table II-2 は、それぞれセフィキシム及びセフピラミドの実験条件と局所モーメント特性値を示す。セフィキシムとセフピラミドの解析結果を 5% 有意水準の分散分析により比較したところ、平均通過時間  $\bar{t}_H$ 、相対分散比  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  に関しては有意な差は認められず、通過率  $F_H$  のみに差が認められた。セフィキシムとセフピラミドの通過率はそれぞれ96.4%、81.1%と算出され、これより血液部から肝組織への移行率はそれぞれ 3.6%、18.9%となり、セフピラミドはセフィキシムよりも肝組織内へ取り込まれやすいことが示された。また、平均通過時間は両薬物共に約 7 秒と算出された。この数値は、両薬物の平均胆汁排泄時間と比較すると無視できるほど小さな値であり、肝血液部から肝組織への取り込み過程はそれ以降の動態過程と比較して瞬時であることが示された。

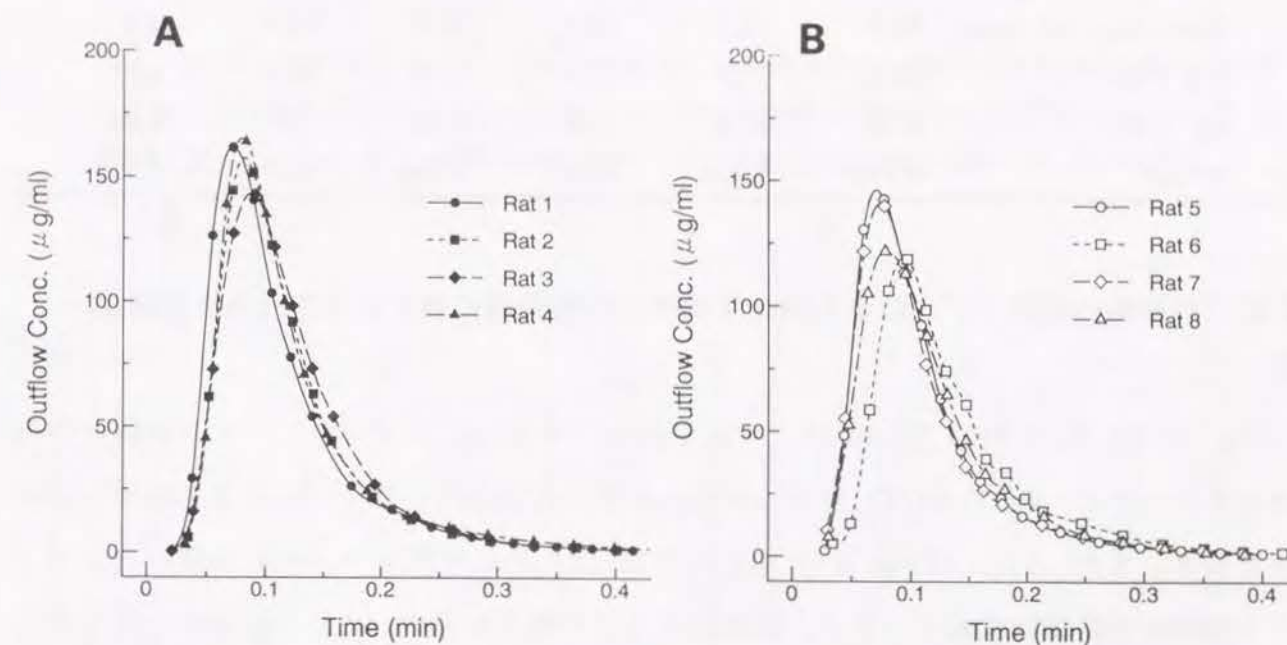


Fig. II-5 Venous perfusate concentration vs. time plots for (A) cefixime and (B) cefpiramide. (Dose=0.245 mg)



Table II-1

Experimental conditions and moment parameters of venous time profiles of cefixime calculated by the trapezoidal integration

Rat No.	1	2	3	4	Mean	SD
Body weight (g)	186	249	210	186	208	26
Liver weight (g)	7.19	9.37	8.56	8.55	8.42	0.78
Flow rate (mL/min)	16.1	16.6	16.2	16.2	16.3	0.2
$F_H$ (%)	96.2	95.6	97.2	96.7	96.4	0.6
$\bar{t}_H$ (sec)	6.67	7.04	7.29	7.26	7.06	0.25
$\sigma^2/\bar{t}_H^2$	0.307	0.247	0.299	0.231	0.271	0.033

Table II-2

Experimental conditions and moment parameters of venous time profiles of cefpiramide calculated by the trapezoidal integration

Rat No.	5	6	7	8	Mean	SD
Body weight (g)	232	238	204	222	224	13
Liver weight (g)	8.24	8.45	8.37	8.85	8.48	0.23
Flow rate (mL/min)	16.0	16.4	16.6	16.8	16.5	0.3
$F_H$ (%)	82.0	79.4	80.4	82.0	80.9	1.1
$\bar{t}_H$ (sec)	6.56	8.13	6.58	6.99	7.06	0.64
$\sigma^2/\bar{t}_H^2$	0.292	0.235	0.309	0.260	0.274	0.029

#### 1-6. 肝細胞内拡散モデルによる胆汁中排泄の時間経過に対する当てはめ計算結果

Fig. II-6A 及び Fig. II-6B は、それぞれセフィキシム及びセフピラミドの胆汁中排泄速度データと、MULTI(FILT) を用いた(II-8)式の肝細胞内拡散モデルによる当てはめ結果を表す。また、Fig. II-7A 及び Fig. II-7B は、それぞれセフィキシム及びセフピラミドの胆汁中累積排泄量データと、同様の当てはめ結果を表す。これらの図から明らかなように、両薬物の観測データと肝細胞内拡散を考慮した本モデルによる理論曲線とは良好に一致した。Table II-3 及び Table II-4 は、それぞれセフィキシム及びセフピラミドの肝細胞内拡散モデルから推定されたモデルパラメータ値と局所モーメント特性値を示す。モデルパラメータより算出した胆汁排泄率  $F_{bile}$  及び平均胆汁排泄時間  $\bar{t}_{bile}$  と、モデル非依存的方法に従い台形公式より計算した局所モーメント特性値は、両薬物において良好に一致し、本モデルによる当てはめ計算結果の妥当性が示された。セフィキシムとセフピ

ラミドの解析結果を 5% 有意水準の分散分析で比較すると、 $F_{bile}$  はセフィキシムでは 3.6 %、セフピラミドでは 10.6 % と算出され有意な差があった。 $\bar{t}_{bile}$  についても、セフィキシムでは 23.1 min、セフピラミドでは 13.5 min と算出され有意な差があった。

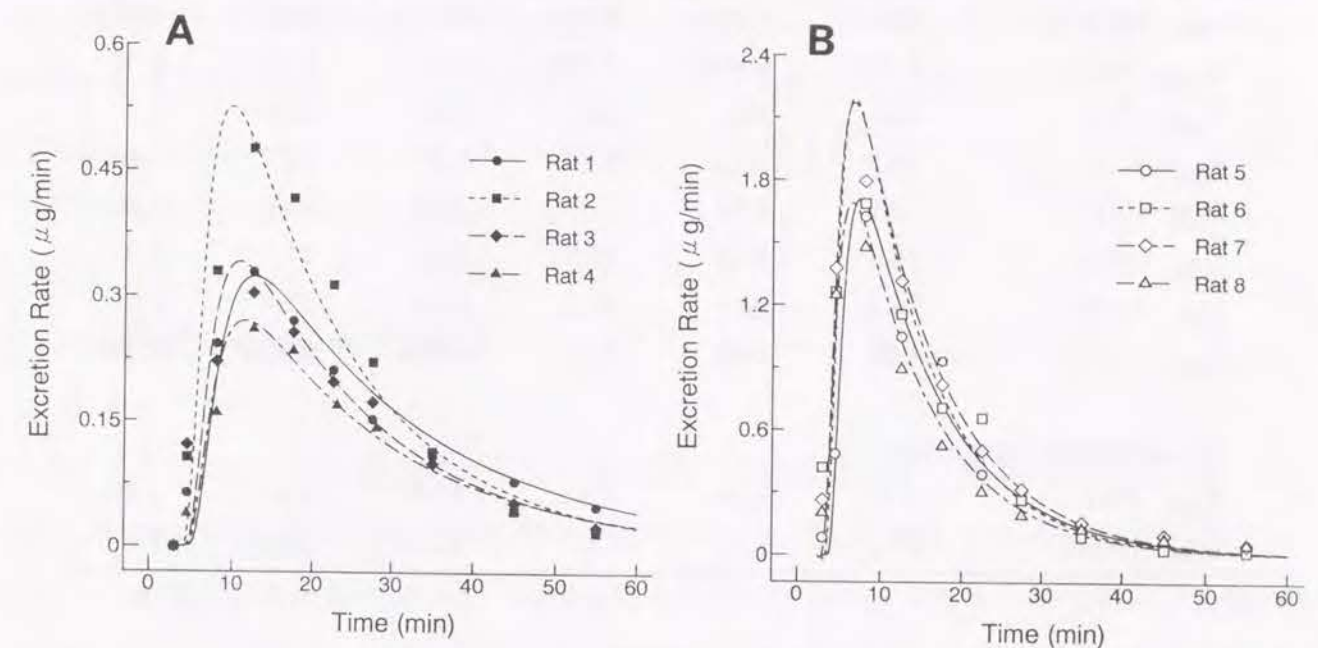


Fig. II-6 Biliary excretion rate vs. time plots and the results of the curve fitting (lines) according to the hepatocellular diffusion model by MULTI(FILT) for (A) cefixime and (B) cefpiramide. (Dose=0.245mg)

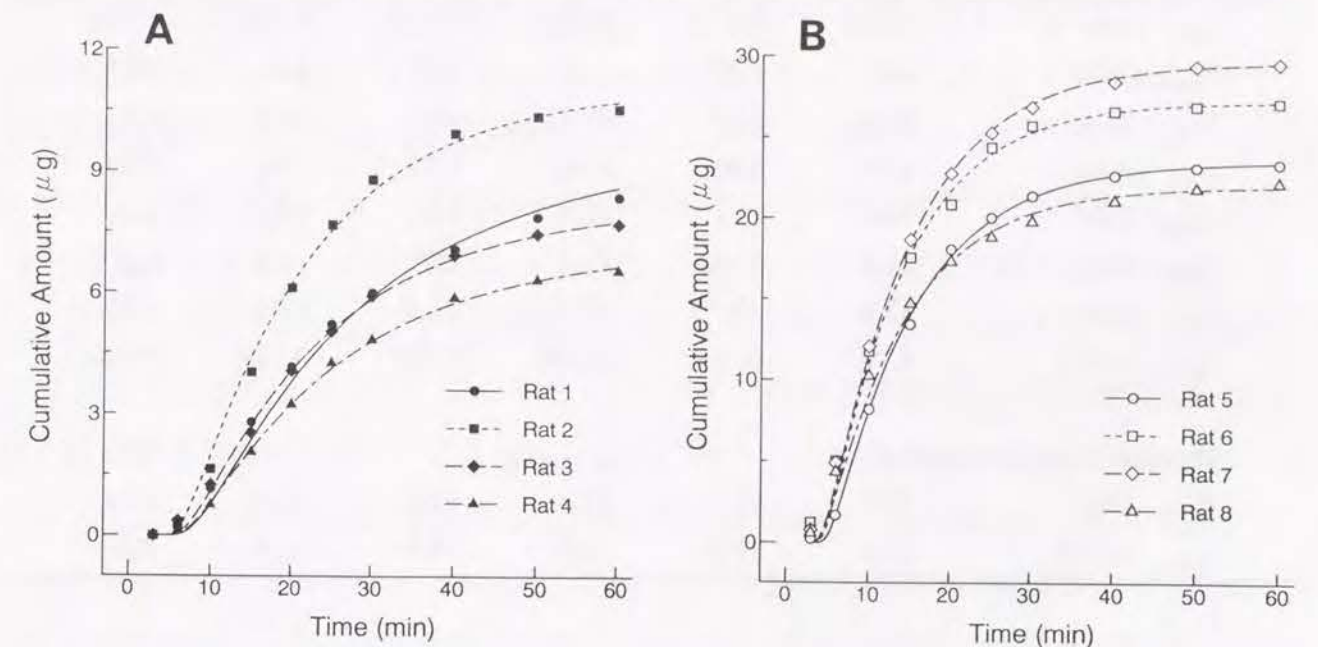


Fig. II-7 Cumulative excreted amount vs. time plots and the results of the curve fitting (lines) according to the hepatocellular diffusion model by MULTI(FILT) for (A) cefixime and (B) cefpiramide. (Dose=0.245mg)



Table II-3

Results of curve fitting according to the hepatocellular diffusion model for cefixime by MULTI(FILT), and moments calculated by numerical integration

Rat No.	1	2	3	4	Mean	SD
$k_{dif}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.019	0.027	0.021	0.023	0.023	0.003
$k_{bmc}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.996	0.969	0.993	1.12	1.02	0.06
$F_{hbt}$ (%)	102	104	106	102	103	1.7
$t_{can}$ (min)	1.43	1.21	1.16	1.27	1.27	0.10
$F_{bile}$ (%)	3.91	4.54	2.93	3.36	3.69	0.60
$t_{bile}$ (min)	28.8	20.8	25.7	23.6	24.7	2.9
$t_{dif}$ (min)	26.3	18.5	23.5	21.4	22.4	2.9
$t_{bmc}$ (min)	1.00	1.03	1.01	0.892	0.984	0.054
By numerical integration						
$F_{bile}$ (%)	3.77	4.39	2.82	3.29	3.57	0.58
$t_{bile}$ (min)	27.4	19.2	23.7	22.0	23.1	3.0

Table II-4

Results of curve fitting according to the hepatocellular diffusion model for cefpiramide by MULTI(FILT), and moments calculated by numerical integration

Rat No.	5	6	7	8	Mean	SD
$k_{dif}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0.042	0.047	0.042	0.044	0.044	0.002
$k_{bmc}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	1.42	1.30	1.43	1.27	1.36	0.07
$F_{hbt}$ (%)	53.5	53.9	61.7	49.9	54.8	4.3
$t_{can}$ (min)	1.05	1.05	0.46	0.70	0.81	0.25
$F_{bile}$ (%)	9.61	11.1	12.1	8.98	10.5	1.2
$t_{bile}$ (min)	13.8	12.5	13.1	12.7	13.0	0.5
$t_{dif}$ (min)	12.0	10.7	11.9	11.3	11.5	0.5
$t_{bmc}$ (min)	0.703	0.768	0.700	0.785	0.739	0.038
By numerical integration						
$F_{bile}$ (%)	9.57	11.1	12.4	9.25	10.6	1.24
$t_{bile}$ (min)	13.8	12.2	14.1	14.0	13.5	0.8

$F_{hbt}$  の推定値より、セフィキシムは肝臓内に取り込まれてから胆汁中へほぼ 100 % 排泄されるのに対して、セフピラミドは55%だけが胆汁中へ排泄され、残りの約 50% は別の経路によって肝臓内から消失することが示された。セフィキシム及びセフピラミドの

$k_{dif}$  は、それぞれ  $2.27 \pm 0.29 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ 、 $4.36 \pm 0.21 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  と推定された。セフピラミドの  $k_{dif}$  はセフィキシムの約 2 倍であることから、セフピラミドはセフィキシムよりも迅速に肝細胞内を拡散できること、並びに肝細胞内における非結合型と結合型との比率(即ち、非結合型・可溶性蛋白質との結合型・オルガネラとの結合型の比率)が両薬物間ではかなり異なることが示唆された。セフィキシム及びセフピラミドの  $k_{bmc}$  は、それぞれ  $1.02 \pm 0.06 \text{ min}^{-1}$ 、 $1.36 \pm 0.07 \text{ min}^{-1}$  と推定され、セフピラミドの  $k_{bmc}$  はセフィキシムの約 1.3 倍であった。

#### 1-7. 肝細胞内拡散に関する考察

セフィキシムの  $k_{dif}$  はセフピラミドと比較して有意に小さい値であったのに対して、セフィキシムの  $F_{hbt}$  はほぼ 100% でありセフピラミドは約 50% であった。肝細胞内に存在する生体高分子と薬物分子との結合は可逆的であると仮定すると、細胞質の蛋白質やオルガネラへの結合性が高い薬物の細胞内移動は、結合性が低い薬物と比べるとかなり抑えられると予測されている(94, 103)。例えば、肝機能診断用色素であるインドシアニンググリーンは、オルガネラや細胞質蛋白質に非常に強く結合することが知られており、胆汁中排泄が血漿中濃度推移と比べて相当に遅延する(89, 91)。Stock らは、前述したように分子量 65000 の fluorescein isothiocyanate-dextran(FITC-DEX) が 1 つの肝細胞内を移動する際の濃度勾配を直接測定し、実際にこの高分子が肝細胞内でゆっくりと拡散することを示した(95)。Tipping と Ketterer の実験結果に従い肝細胞の有効拡散長  $L$  を 0.01 cm に設定すると(94)、FITC-DEX の  $k_{dif}$  は  $0.032 \sim 0.109 \text{ min}^{-1}$  と推定され、セフィキシムやセフピラミドの  $k_{dif}$  と近い値になる。セフィキシムやセフピラミドの分子量は、FITC-DEX と比べるとかなり小さいので、オルガネラや細胞質蛋白質と相互作用せずに非結合型薬物が受動的に拡散すると仮定すれば、セフィキシムやセフピラミドの  $k_{dif}$  は FITC-DEX よりもかなり大きい値となるはずである。予測値よりもかなり小さく推定されたセフィキシムとセフピラミドの  $k_{dif}$  は、おそらく肝細胞内における両薬物と生体高分子との相互作用によるものと示唆される。フェノバルビタール投与によって細胞質内の薬物輸送担体であるライガンディンの増加が誘導された肝臓では、ビリルビン、インドシアニンググリーン、及びスルホプロモフタレインの肝抽出率が増加すると報告されている(7)。



以上から、セフィキシムはライガンディンのような細胞質蛋白質と相互作用しながら、セフピラミドと比べて肝細胞内をより緩やかではあるがより効率的に胆管腔側へと移動するものと推察される。

#### 1-8. 肝胆系輸送動態の律速段階過程

平均胆汁排泄時間  $\bar{t}_{bile}$  は(II-10)式より 3 つの通過時間、即ち  $\bar{t}_{dif}$ 、 $\bar{t}_{bmc}$ 、及び  $\bar{t}_{can}$  から成る。セフィキシム及びセフピラミドについて、肝細胞内拡散に要する平均通過時間  $\bar{t}_{dif}$  はそれぞれ 22.4 min、11.5 min と算出され、両薬物間で有意な差が認められた。胆管腔膜透過に要する平均通過時間  $\bar{t}_{bmc}$  はそれぞれ 0.98 min、0.74 min と算出され、速い過程のため僅かな違いではあるが両薬物間で有意な差が認められた。一方、胆管腔通過に要する平均通過時間  $\bar{t}_{can}$  は両薬物共に約 1 分と算出され差は認められなかった。これは、 $\bar{t}_{can}$  が薬物の特性に無関係で、胆汁流量と胆管の構造に依存したパラメータであるためと考えられる。両薬物共に局所動態における肝胆系輸送の律速段階は、細胞内の拡散による移動過程であり、細胞内での薬物分布は瞬時平衡とならないことが明らかとなった。この過程は、前述したように薬物と肝細胞との相互作用にかなり依存すると考えられる。3 つの各移行過程に要する平均通過時間と移行率に関して Fig. II-8 にまとめた。

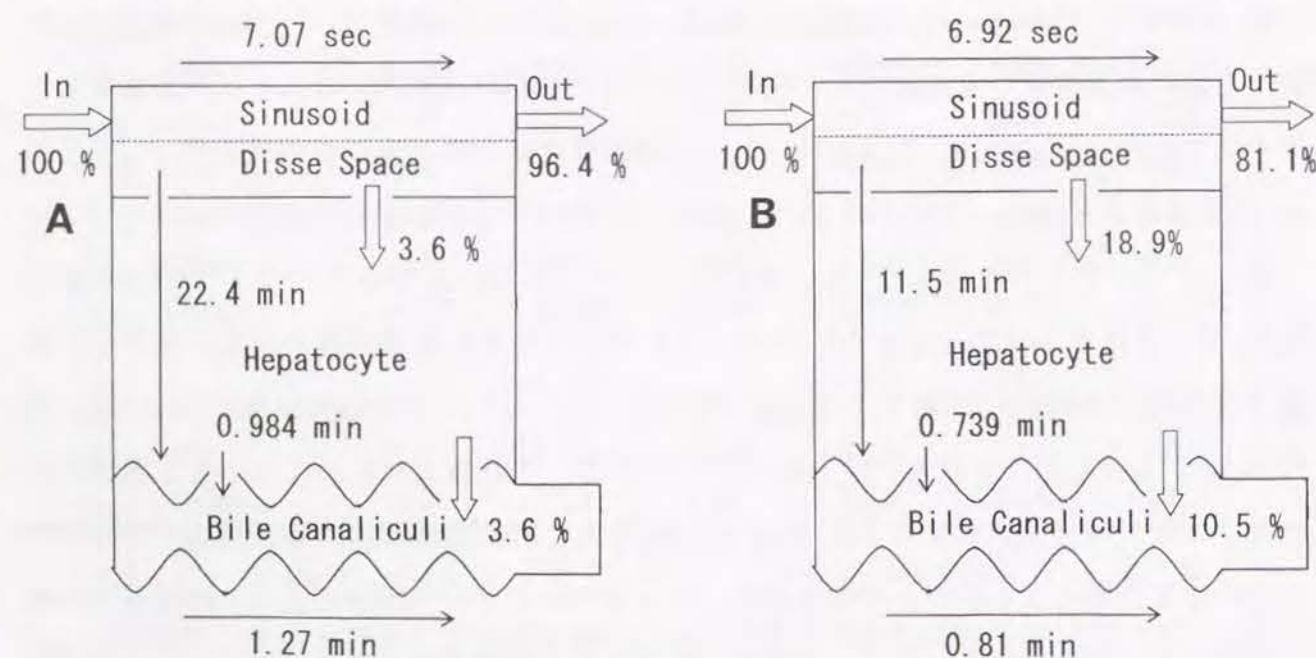


Fig. II-8 Schematic representation of hepatobiliary transport of (A) cefixime and (B) cefpiramide in single-pass rat liver perfusion system.

#### 1-9. タウロコール酸添加による胆汁流量増加が肝胆系輸送に及ぼす影響

胆汁排泄の時間経過が、胆汁流量の増減によりどのように影響されるかを確認するために、灌流液中に抱合型胆汁酸であるタウロコール酸を加えて胆汁流量を増加させた時のセフィキシムの肝胆系輸送動態の変動について検討を加えた。

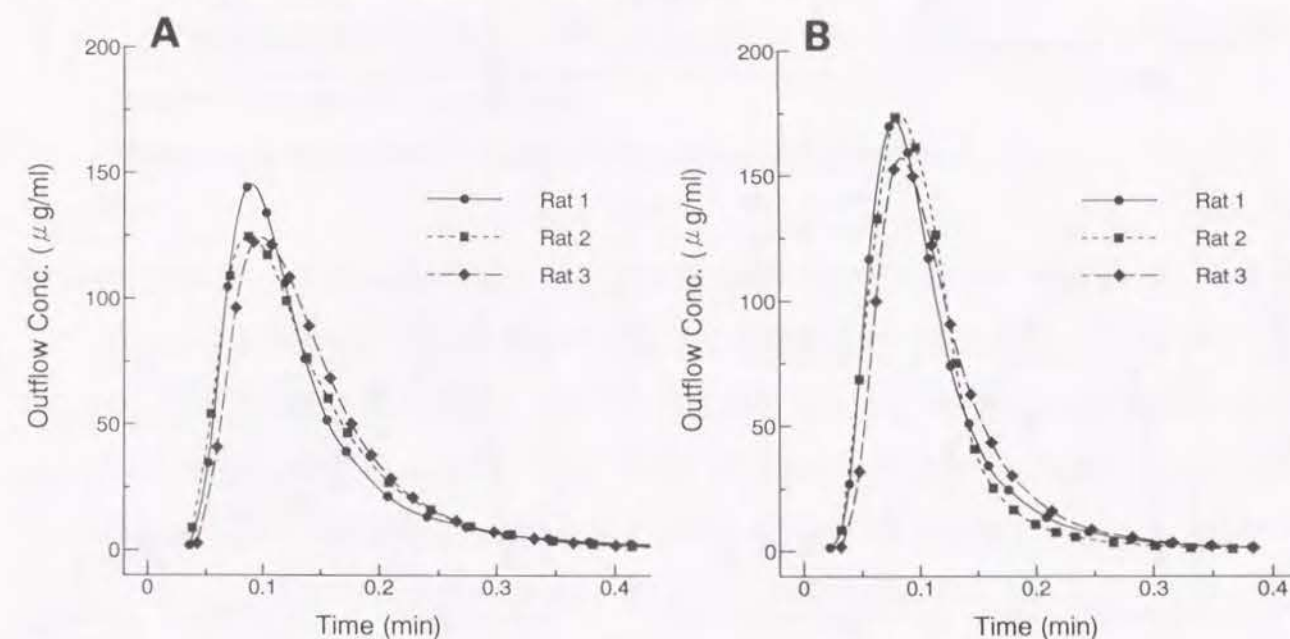


Fig. II-9 Venous perfusate concentration vs. time plots for cefixime in the presence of (A) 25  $\mu$ M and (B) 50  $\mu$ M taurocholate. (Dose=0.245 mg)

Table II-5

Experimental conditions and local moment parameters of venous time profiles of cefixime calculated by the trapezoidal integration in the presence of taurocholate

taurocholate conc. ( $\mu$ M)	25 (n=3)	50 (n=3)
Body weight (g)	223 $\pm$ 10	227 $\pm$ 9
Liver weight (g)	9.11 $\pm$ 0.25	8.93 $\pm$ 0.67
Flow rate (mL/min)	16.3 $\pm$ 0.1	16.3 $\pm$ 0.1
$F_H$ (%)	96.0 $\pm$ 0.5	96.6 $\pm$ 0.04
$\bar{t}_H$ (sec)	8.14 $\pm$ 0.19	6.65 $\pm$ 0.32
$\sigma^2/\bar{t}_H^2$	0.257 $\pm$ 0.036	0.215 $\pm$ 0.036

Results are reported as mean $\pm$ s.d.

Numbers in parentheses represent the number of experiments.



Fig. II-9A 及び Fig. II-9B は、それぞれ灌流液中にタウロコール酸濃度を  $25 \mu\text{M}$  及び  $50 \mu\text{M}$  として添加した時の肝静脈側への溶出濃度の時間推移を表す。Table II-5 は、タウロコール酸濃度が  $25 \mu\text{M}$  及び  $50 \mu\text{M}$  群の実験条件と台形公式より計算したセフィキシムの溶出濃度推移の局所モーメント特性値を示す。タウロコール酸を添加しないコントロール群も含めた解析結果を 5% 有意水準の分散分析により比較したところ、通過率  $F_H$ 、平均通過時間  $\bar{t}_H$ 、相対分散比  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  の全てに関して有意な差は認められなかった。

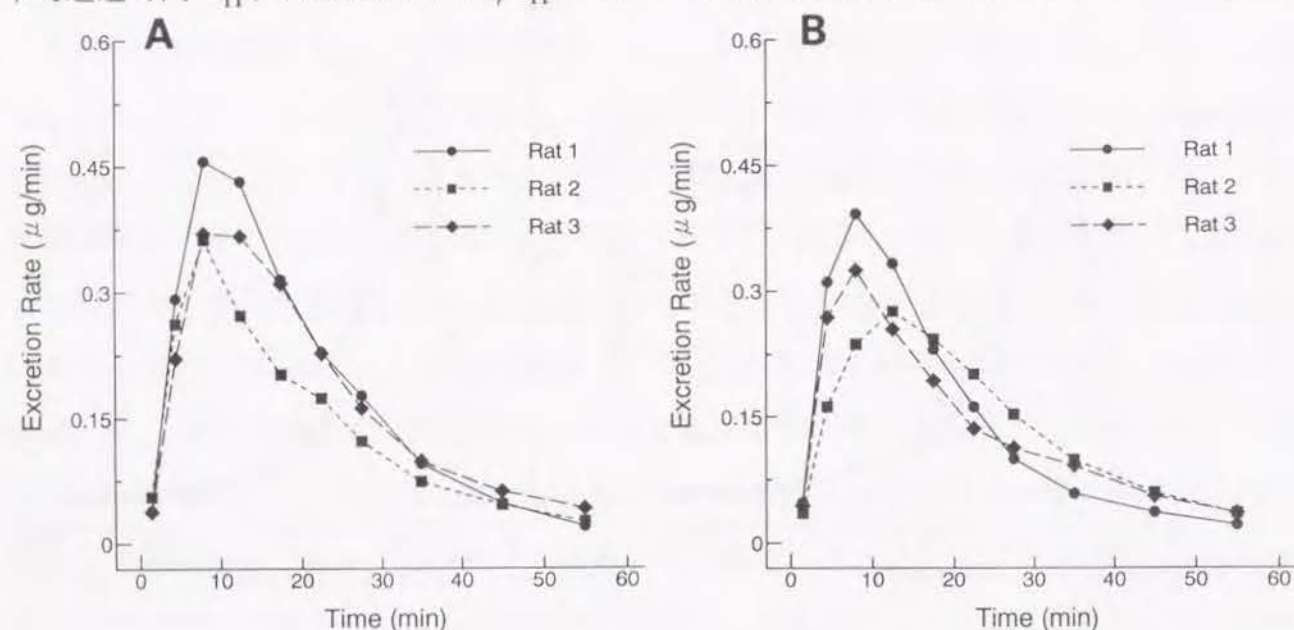


Fig. II-10 Biliary excretion rate vs. time plots for cefixime in the presence of (A)  $25 \mu\text{M}$  and (B)  $50 \mu\text{M}$  taurocholate. (Dose=0.245 mg)

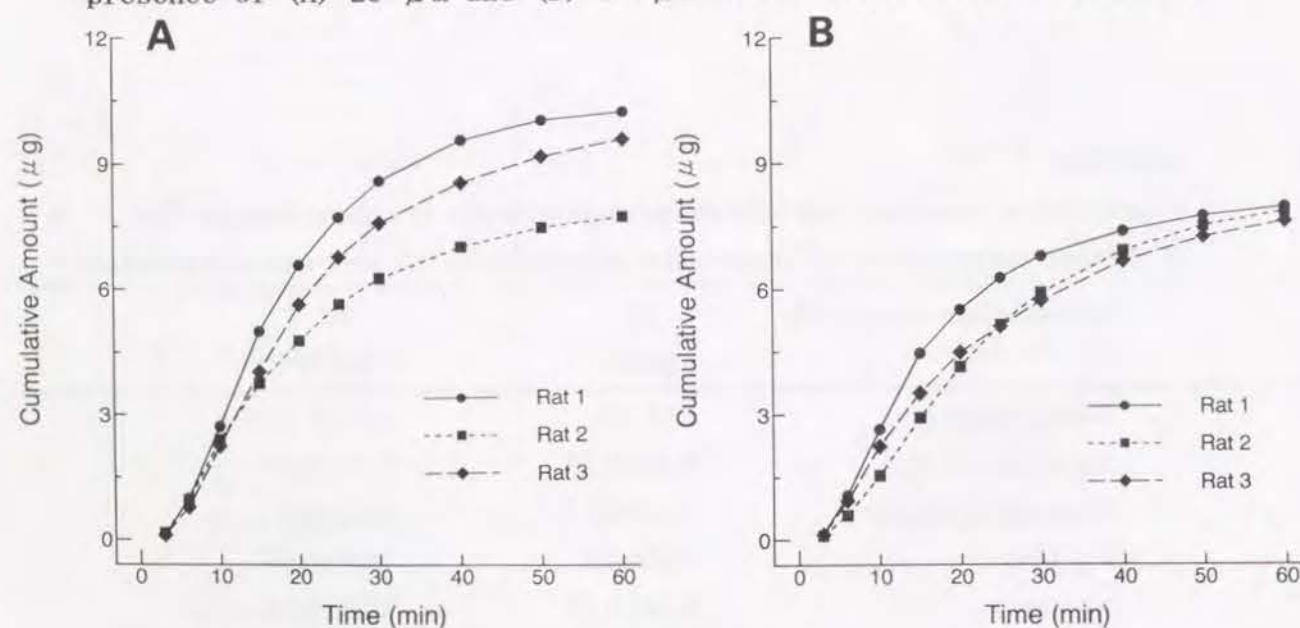


Fig. II-11 Cumulative excreted amount vs. time plots for cefixime in the presence of (A)  $25 \mu\text{M}$  and (B)  $50 \mu\text{M}$  taurocholate. (Dose=0.245 mg)

Table II-6

Local moment parameters of biliary excretion time profiles of cefixime calculated by numerical integration in the presence of taurocholate

taurocholate conc. ( $\mu\text{M}$ )	25	50
	(n=3)	(n=3)
$F_{\text{bile}}$ (%)	$3.91 \pm 0.43$	$3.37 \pm 0.03$
$\bar{t}_{\text{bile}}$ (min)	$20.9 \pm 1.9$	$22.2 \pm 3.1$
bile flow rate ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	$8.90 \pm 0.16$	$7.28 \pm 0.34$

Results are reported as mean  $\pm$  s.d.

Numbers in parentheses represent the number of experiments.

Fig. II-10 及び Fig. II-11 は、それぞれ灌流液中にタウロコール酸を添加した時のセフィキシムの胆汁中への排泄速度データ及び累積排泄量データを表す。Table II-6 は、タウロコール酸添加群の胆汁流量と、モデル非依存的方法に従い台形公式より計算したセフィキシムの胆汁排泄経過の局所モーメント特性値を示す。タウロコール酸を添加しないコントロール群も含めた解析結果を 5% 有意水準の分散分析により比較したところ、胆汁中への回収率  $F_{\text{bile}}$  及び平均排泄時間  $\bar{t}_{\text{bile}}$  に関して有意な差は認められなかった。一方、コントロール群では  $4 \mu\text{L}/\text{min}$  であった胆汁流量が、タウロコール酸を添加することにより  $7 \sim 9 \mu\text{L}/\text{min}$  にまで有意に増加した。溶出濃度及び胆汁排泄の両方について、コントロール群とタウロコール酸添加群との間で時間経過と局所モーメント特性値には共に有意な差は観測されず、胆汁流量の増加はセフィキシムの肝胆系輸送動態に影響しないことが明らかとなった。

#### 1-10. *in vivo* 胆汁排泄動態モデルとの比較

Sathirakul らは、静脈内瞬時投与後の全身系胆汁排泄を表現するための拡散モデルを構築している(96)。彼らのモデルは全身系薬物動態の速度論と関連しているので、血液と肝臓との間の薬物移行に influx 過程及び efflux 過程の両方を考慮する必要がある。一方、本節における拡散モデルは、single-pass の肝灌流実験系における瞬時投与後の局所肝胆系排泄過程の速度論を扱うために開発されている。従って、本モデルの初期条件及び境界条件は、Sathirakul らのモデルの複雑な条件とは完全に異なっており、彼らのモデ



ルと比較するとかなり簡便なモデル式なので、実際の観測データに対してより適用しやすい解析法である。本節で開発された解析法は、非定常状態における薬物の肝臓内局所動態をより詳細に解明する有用な方法であり、排泄抑制剤の作用、代謝過程の速度論的評価、薬物と細胞内結合蛋白質との相互作用の評価などにも応用できると期待される。

## 第 2 節 代謝過程を含んだ胆汁中排泄過程のモデル非依存的な局所モーメント解析

非ステロイド系抗炎症薬として汎用されている 2-アリルプロピオン酸(プロフェン類)には、R 体と S 体の光学対掌体(enantiomer)が存在するが、臨床治療においてはラセミ体として投与されている。プロフェン類は、プロスタグランジンの生合成を阻害することにより抗炎症作用を発揮するが、*in vitro* 試験結果よりその活性のほとんどは S 体によることが確認されている(104, 105)。最近になって、これまで不活性と考えられていた R 体にも異なった薬理活性(例えば鎮痛作用)のあることが報告されている(106)。プロフェン類の光学対掌体間では、薬物動態特性に関して顕著な相違のある場合が多い(107-109)。例えば、プロフェン類の代表的薬物であるイブプロフェンやフェノプロフェンは、ヒトにおいて、不活性な R 体から活性な S 体へと一方向性のキラル変換が起こることが知られている(110-112)。従って、プロフェン類の光学対掌体の立体選択的な体内動態特性について正確な情報を把握することが、薬剤学や薬理学の研究分野においては必須の課題である。キラル変換の正確な機構はいまだ完全には解明されていないが、この反応過程は補酵素 A によって媒介され、プロフェン類がアシル CoA チオエステルを形成して進行すると示唆されている(113-116)。ラットでは、主に肝臓において R 体から S 体へと変換されると予測されている(117-121)、他の臓器や部位、例えば消化管においてこの立体異性化がおこる可能性も示唆されている(117, 122)。プロフェン類の代表的薬物であるケトプロフェンもラセミ体として使用されている。ケトプロフェンの立体選択的な体内動態は、主にラットやヒトの全身系薬物動態試験により研究されてはきたが(123-126)、これらの研究のほとんどは、ラセミ体投与後のケトプロフェン光学対掌体の動態特性を調べているにすぎない。ケトプロフェンの両光学対掌体は、ラットにおいて共にグルクロン酸抱合された後、選択的に胆汁中へと排泄されるが、血漿中薬物濃度の時間推移は両光学対掌体間でかなり異なる(125)。この相違は、主に R 体から S 体への一方向性のキラル変換に依るものと考えられている(126)。しかしながら、ケトプロフェンの立体選択的な局所動態に関する研究は非常に限られており、体内からの主な消失経路である胆汁中排泄過程について詳しく評価した報告例はない。本節では、single-pass の肝灌流実験系においてケトプロフェンの R 体または S 体を瞬時投与した後の胆汁中排泄の時間経過から、キラル変換の代謝過程を含んだ局所排泄動態を評価するために、局所モーメント値を用いたデコンボリューション計算に基づくモデル非依存的解析法を構築した。



## 2-1. 代謝過程を含んだ胆汁中排泄動態のモデル非依存的な局所モーメント解析

ケトプロフェン光学対掌体の肝静脈側溶出濃度の時間推移に対する肝局所モーメント特性値  $F_H$ 、 $\bar{t}_H$ 、及び  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  は、第 1 章と同様にモデル非依存的解析法に基づいた定義式である (I-13) ~ (I-15) 式に従い計算した。即ち、実測点に対しては線形台形公式による積分計算を適用し、また terminal phase に対しては最小二乗法により一次速度式に当てはめて無限時間まで外挿した値を算出した。また、肝抽出率  $E_H (= 1 - F_H)$  は通過率  $F_H$  から計算した。一方、ケトプロフェン光学対掌体の未変化体及びグルクロン酸抱合体の胆汁中排泄の時間経過に対しては、モデル非依存的解析法に基づいた定義式である以下の (II-11) ~ (II-13) 式に従い、局所モーメント特性値である胆汁排泄率  $F_{bile}$ 、平均胆汁排泄時間  $\bar{t}_{bile}$ 、及び排泄時間の分散  $\sigma_{bile}^2$  を計算した (37)。溶出濃度の場合と同様に、実測点に対しては線形台形公式による積分計算を適用し、また terminal phase に対しては最小二乗法により一次速度式に当てはめて無限時間まで外挿した値を算出した (37)。

$$F_{bile} = \frac{\int_0^\infty \{dX_{bile}(t)/dt\} dt}{M} \quad (II-11)$$

$$\bar{t}_{bile} = \frac{\int_0^\infty \{t \cdot dX_{bile}(t)/dt\} dt}{\int_0^\infty \{dX_{bile}(t)/dt\} dt} \quad (II-12)$$

$$\sigma_{bile}^2 = \frac{\int_0^\infty \{(t - \bar{t}_{bile})^2 \cdot dX_{bile}(t)/dt\} dt}{\int_0^\infty \{dX_{bile}(t)/dt\} dt} \quad (II-13)$$

ここで、 $dX_{bile}(t)/dt$  は胆汁排泄速度、 $M$  は投与量を表す。一方、 $R$  体からキラル変換された  $S$  体の局所動態が、 $S$  体投与後の  $S$  体自身の局所動態と同じであると仮定すれば、 $R$  体投与後の変換された  $S$  体の胆汁中排泄速度は、以下のたたみこみ積分 (コンボリューション) によって表される (127)。

$$\frac{dX_{bile}^{R \rightarrow S}(t)}{dt} = \int_0^t f_{R \rightarrow S}(\tau) \frac{dX_{bile}^S(t - \tau)}{dt} d\tau \quad (II-14)$$

ここで、 $dX_{bile}^{R \rightarrow S}(t)/dt$  は  $R$  体から変換された  $S$  体の胆汁排泄速度を、 $dX_{bile}^S(t)/dt$  は  $S$  体自身の胆汁排泄速度をそれぞれ表し、 $f_{R \rightarrow S}(t)$  は肝臓内における  $R$  体から  $S$  体へのキラル変換に対する重み関数を表す。(II-14) 式のラプラス変換形は、(II-15) 式により与えられる。

$$s \cdot \tilde{X}_{bile}^{R \rightarrow S}(s) = \tilde{f}_{R \rightarrow S}(s) \cdot s \cdot \tilde{X}_{bile}^S(s) \quad (II-15)$$

ここで、 $\tilde{f}_{R \rightarrow S}(s)$  は  $f_{R \rightarrow S}(t)$  のラプラス次元の伝達関数である。伝達関数とモーメント特性値との関係から、以下の (II-16) 式及び (II-17) 式が誘導される。

$$\begin{aligned} F_{bile}^{R \rightarrow S} &= \frac{\lim_{s \rightarrow 0} s \cdot \tilde{X}_{bile}^{R \rightarrow S}(s)}{M} = \lim_{s \rightarrow 0} \tilde{f}_{R \rightarrow S}(s) \cdot \frac{\lim_{s \rightarrow 0} s \cdot \tilde{X}_{bile}^S(s)}{M} \\ &= F_{R \rightarrow S} \cdot F_{bile}^S \end{aligned} \quad (II-16)$$

$$\begin{aligned} \bar{t}_{bile}^{R \rightarrow S} &= \lim_{s \rightarrow 0} \frac{-d}{ds} \ln s \cdot \tilde{X}_{bile}^{R \rightarrow S}(s) = \lim_{s \rightarrow 0} \frac{-d}{ds} \ln \tilde{f}_{R \rightarrow S}(s) + \lim_{s \rightarrow 0} \frac{-d}{ds} \ln s \cdot \tilde{X}_{bile}^S(s) \\ &= \bar{t}_{R \rightarrow S} + \bar{t}_{bile}^S \end{aligned} \quad (II-17)$$

ここで、 $F_{bile}^{R \rightarrow S}$  及び  $F_{bile}^S$  は、それぞれ  $R$  体投与後及び  $S$  体投与後の  $S$  体の胆汁中への回収率を表し、 $\bar{t}_{bile}^{R \rightarrow S}$  及び  $\bar{t}_{bile}^S$  は、それぞれ  $R$  体投与後及び  $S$  体投与後の  $S$  体の胆汁中への平均通過時間を表す。以上より、キラル変換による異性化率  $F_{R \rightarrow S}$  及び平均異性化時間  $\bar{t}_{R \rightarrow S}$  は、以下の (II-18) 式及び (II-19) 式により算出できる。

$$F_{R \rightarrow S} = \frac{F_{bile}^{R \rightarrow S}}{F_{bile}^S} \quad (II-18)$$

$$\bar{t}_{R \rightarrow S} = \bar{t}_{bile}^{R \rightarrow S} - \bar{t}_{bile}^S \quad (II-19)$$



## 2-2. ラット肝臓灌流実験法及び灌流液中薬物定量法

ケトプロフェン(キッセイ薬品)の光学対掌体は、後述する HPLC システムにより分析用光学分離カラム SUMICHIRAL OA-2500(4.6 mm i.d. x 250 mm、住化分析センター)を用いてラセミ体から R 体と S 体を分取した。両光学対掌体の純度は、同様の HPLC システムで定量したところ 99% 以上であった。各光学対掌体の分取フラクションを集めて溶媒を除去後、灌流液に溶解させた後適当な濃度に調節して投与試料とした。

ラット肝灌流実験は、第 1 章と同様の Mortimore 肝灌流法に基づき行った。アルブミン及び赤血球は、灌流液中には加えなかった。灌流液の流速は 15 ml/min に設定した。15 分の安定期間の後、ケトプロフェンの R 体あるいは S 体(250  $\mu$ g/ml)を溶解させた灌流液 0.250 ml を六方バルブインジェクタを用いて、門脈内に挿入したカニューレから肝臓内へ瞬時投与した。肝静脈に挿入したカニューレから、溶出液を約 1 秒ごとに 1 分間採取し、同時に胆管カニューレから投与直後は 3 分間隔で、以後 5 分間隔で 1 時間胆汁を採取した。胆汁流量を確保するために、タウロコール酸を 16.7  $\mu$ M の濃度となるように灌流液中に添加した。肝臓の活性は、胆汁流量(7  $\mu$ l/min, 0.75  $\mu$ l/min/g liver)により確認した。モーメント解析による数値計算を行う前に、薬物の排泄データからカニューレの通過時間を差し引いた。

ケトプロフェンの各光学対掌体の灌流液中濃度及び胆汁中濃度は、カラムスイッチング法を備えた HPLC システムにより定量した(128)。本分析システムは、灌流液試料や胆汁試料を直接注入することにより、試料中の各光学対掌体濃度を同時に分離定量できる。HPLC システム(LC-10A、島津製作所)は、UV detector(SPD-10A、島津製作所)、前処理用カラムには L-column(4.6 mm i.d. x 30 mm、化学品検査協会)、分析用光学分離カラムには SUMICHIRAL OA-2500(4.6 mm i.d. x 250 mm、住化分析センター)を使用し、六方スイッチングバルブにより接続した。流速を 1.0 ml/min とし、前処理用移動相には 0.02 M の酢酸アンモニウム溶液(pH 6.8)を、分析用移動相には 0.6 M の酢酸緩衝液とメタノールとの混液(5:95 v/v)をそれぞれ用いた。検出波長を 262 nm とし、カラム温度を 25  $^{\circ}$ C に設定した。採取した各溶出液試料 100  $\mu$ l を直接 HPLC に注入した。各胆汁試料は 1.0 ml の生理食塩水で希釈し、100  $\mu$ l を HPLC に注入した。さらに、希釈した各胆汁試料 200  $\mu$ l に 1 M の NaOH 100  $\mu$ l を加えて攪拌し、室温で 30 分間加水分解処理を

行った(129)。1 M の HCl 100  $\mu$ l を加えて中和させた後、各試料 100  $\mu$ l を HPLC に注入した。アルカリ加水分解による未変化体の安定性を確認し、加水分解処理した試料と無処理の試料との濃度差からグルクロン酸抱合体濃度を定量した。両光学対掌体の検量線の相関係数は、実験条件の濃度範囲において 0.999 以上であった。

## 2-3. 肝静脈側溶出濃度の時間推移と肝局所モーメント特性値

Fig. II-12A 及び Fig. II-12B は、それぞれケトプロフェンの R 体及び S 体の肝静脈側への溶出濃度の時間推移を表す。また、Table II-7 は、ケトプロフェンの両光学対掌体の実験条件と溶出濃度推移の局所モーメント特性値を示す。両光学対掌体の解析結果を 5% 有意水準の分散分析により比較したところ、通過率  $F_H$ 、平均通過時間  $\bar{t}_H$ 、及び相対分散比  $\sigma^2/\bar{t}_H^2$  に関して有意な差は認められなかった。両光学対掌体の肝抽出率  $E_H(=1-F_H)$  は共にほぼ 100 % と算出され、平均通過時間  $\bar{t}_H$  は共に約 7 秒と算出された。これらの数値から、灌流液中にアルブミンを含まない系においては、ケトプロフェンの両光学対掌体のほぼ全量が血液部から肝組織へと速やかに取り込まれることが示された。

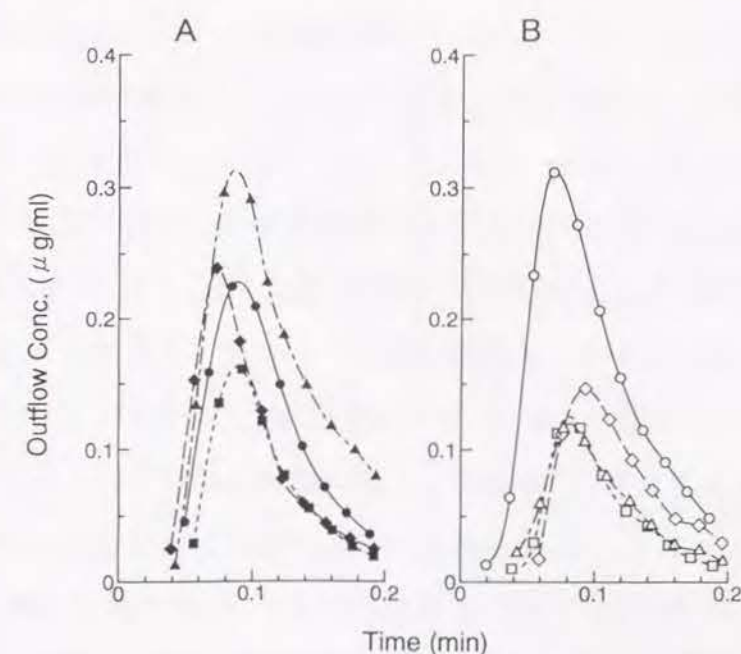


Fig. II-12 Venous perfusate concentration vs. time plots of (A) R- and (B) S-ketoprofen of four rats. (Dose=62.5 $\mu$ g)



Table II-7

Local Moments of Outflow Concentration Time Profiles of R- and S-Ketoprofen Enantiomers Calculated by Numerical Integration

	R-Ketoprofen (n=4)	S-Ketoprofen (n=4)
Body Weight (g)	219±14	217±10
Liver Weight (g)	9.35±0.67	8.94±0.37
F <sub>H</sub> (%)	0.47±0.14	0.40±0.20
E <sub>H</sub> (%)	99.5±0.1	99.6±0.2
$\bar{t}_H$ (sec)	6.81±0.55	7.20±0.62
$\sigma^2/\bar{t}_H^2$	0.209±0.020	0.245±0.017

Results are reported as mean±s.d.

Numbers in parentheses represent the number of experiments.

#### 2-4. 胆汁中排泄の時間経過と肝局所モーメント特性値

Fig. II-13A 及び Fig. II-13B は、それぞれケトプロフェンの R 体投与後の胆汁中排泄速度及び累積排泄量の時間経過を表す。ケトプロフェンの S 体は、R 体からかなりの比率でキラル変換された後、選択的に胆汁中へ排泄されることが報告されている(125)。Fig. II-13 から明らかなように、R 体から変換された S 体の未変化体及びグルクロン酸抱合体の排泄時間推移は、R 体の未変化体及びグルクロン酸抱合体の時間推移と比較して遅延していることが分かる。Table II-8 は、Fig. II-13 に示されたケトプロフェンの R 体投与後の排泄時間推移の局所モーメント特性値を示す。R 体の未変化体の胆汁排泄率  $F_{bile}$ 、平均胆汁排泄時間  $\bar{t}_{bile}$ 、及び相対分散比  $\sigma_{bile}^2/\bar{t}_{bile}^2$  は、それぞれ 3 %、8.3 min、0.57 と算出され、R 体のグルクロン酸抱合体については、それぞれ 9 %、6.5 min、0.47 と算出された。R 体から変換された S 体の未変化体については、それぞれ 7 %、17 min、0.27 と算出され、変換された S 体のグルクロン酸抱合体については、それぞれ 17 %、17 min、0.30 と算出された。変換された S 体の未変化体及びグルクロン酸抱合体の  $F_{bile}$  及び  $\bar{t}_{bile}$  の値を 5% 有意水準の分散分析により R 体の値と比較すると、それぞれが有意に大きかった。一方、Fig. II-14A 及び Fig. II-14B は、それぞれケトプロフェンの S 体投与後の胆汁中排泄速度及び累積排泄量の時間推移を表す。S 体から R 体への逆キラル変換は、灌流液中及び胆汁中では全く観測されなかった。また、S 体投与後には

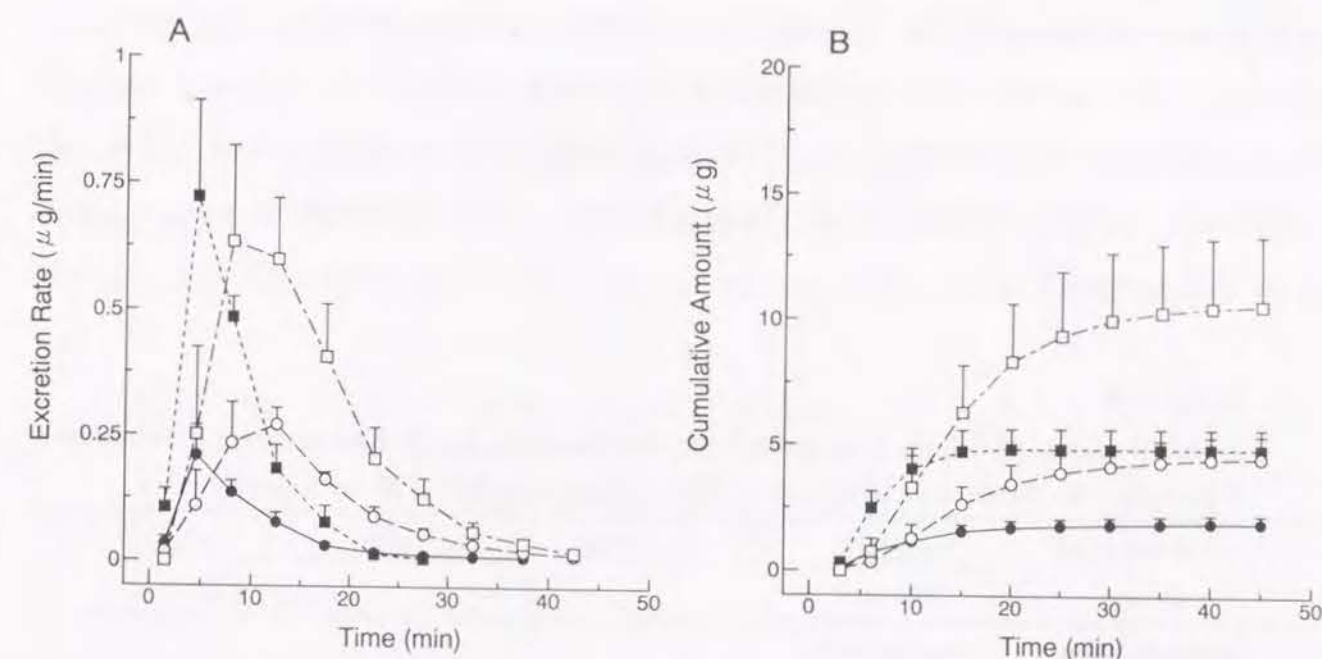


Fig. II-13 Biliary excretion vs. time plots of R- and S-ketoprofen after administration of R-ketoprofen (●:R-unchanged, ■:R-conjugated, ○:S-unchanged, □:S-conjugated). The left panel (A) is excretion rate and the right panel (B) is cumulative amount. (Dose=62.5μg)

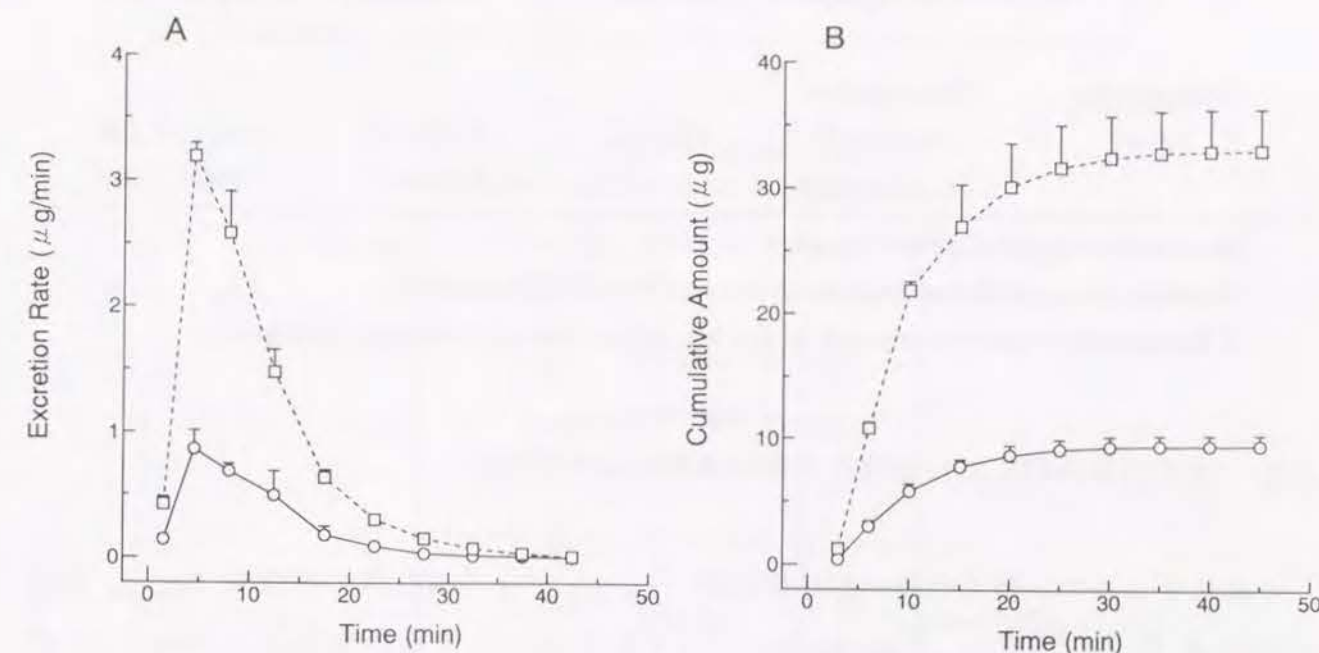


Fig. II-14 Biliary excretion vs. time plots of S-ketoprofen after administration of S-ketoprofen (○:S-unchanged, □:S-conjugated). The left panel (A) is excretion rate and the right panel (B) is cumulative amount. (Dose=62.5μg)



大部分がグルクロン酸抱合体として胆汁中へ排泄された。Table II-8 は、Fig. II-14 に示されたケトプロフェンの S 体投与後の排泄時間推移の局所モーメント特性値も示している。S 体の未変化体の  $F_{bile}$ 、 $\bar{t}_{bile}$ 、及び  $\sigma_{bile}^2/\bar{t}_{bile}^2$  は、それぞれ 15 %、9.6 min、0.53 と算出され、S 体のグルクロン酸抱合体については、それぞれ 53 %、9.2 min、0.56 と算出された。

Table II-8

Local Moments of Biliary Excretion Time Profiles of R- and S-Ketoprofen Enantiomers Calculated by Numerical Integration After Administration of R- or S-Ketoprofen

Administered Drug	Excreted Form	$F_b$ (%)	$\bar{t}_b$ (min)	$\sigma_b^2/\bar{t}_b^2$
<b>R-ketoprofen</b> (n=4)	R-ketoprofen			
	Unchanged	2.92±0.49	8.32±1.37	0.566±0.110
	Conjugated	8.84±1.31	6.54±1.15	0.466±0.080
	S-ketoprofen			
	Unchanged	7.01±1.20	17.1±1.0	0.266±0.017
	Conjugated	16.9±3.9	16.5±1.0	0.301±0.039
<b>S-ketoprofen</b> (n=4)	S-ketoprofen			
	Unchanged	15.3±1.3	9.57±1.07	0.531±0.130
	Conjugated	53.4±5.2	9.15±0.96	0.563±0.080

Results are reported as mean±s.d.

Numbers in parentheses represent the number of experiments.

R-Ketoprofen was not detected in the bile after S-ketoprofen administration.

## 2-5. 光学対掌体間における胆汁中排泄過程の立体選択性

R 体のグルクロン酸抱合体の胆汁排泄率  $F_{bile,conj}$  の、未変化体の排泄率  $F_{bile,un}$  に対する比率  $F_{bile,conj}/F_{bile,un}$  は、 $3.08 \pm 0.51$  であり、一方 S 体の場合は  $3.54 \pm 0.59$  であった。光学対掌体の未変化体間では  $F_{bile,conj}/F_{bile,un}$ 、 $\bar{t}_{bile}$ 、及び  $\sigma_{bile}^2/\bar{t}_{bile}^2$  に関して有意な差はなかった。また、光学対掌体のグルクロン酸抱合体間でも  $\bar{t}_{bile}$ 、及び  $\sigma_{bile}^2/\bar{t}_{bile}^2$  に関して有意な差はなかった。これらの結果は、ケトプロフェンの光学対掌体間において未変化体の胆汁排泄、グルクロン酸抱合体化、並びにグルクロン酸抱合体自身の

胆汁排泄に関しては立体選択性が存在しないことを示唆している。R 体の未変化体の  $\bar{t}_{bile}$  は、R 体のグルクロン酸抱合体の  $\bar{t}_{bile}$  と比べて有意に大きい値であった。また、S 体の未変化体の  $\bar{t}_{bile}$  についても同様であった。グルクロン酸抱合体の  $\bar{t}_{bile}$  が親化合物の  $\bar{t}_{bile}$  よりも小さい値をとるという事実は、グルクロン酸抱合体化反応並びにグルクロン酸抱合体自身の胆汁排泄が非常に速い過程であることを証明するものである。

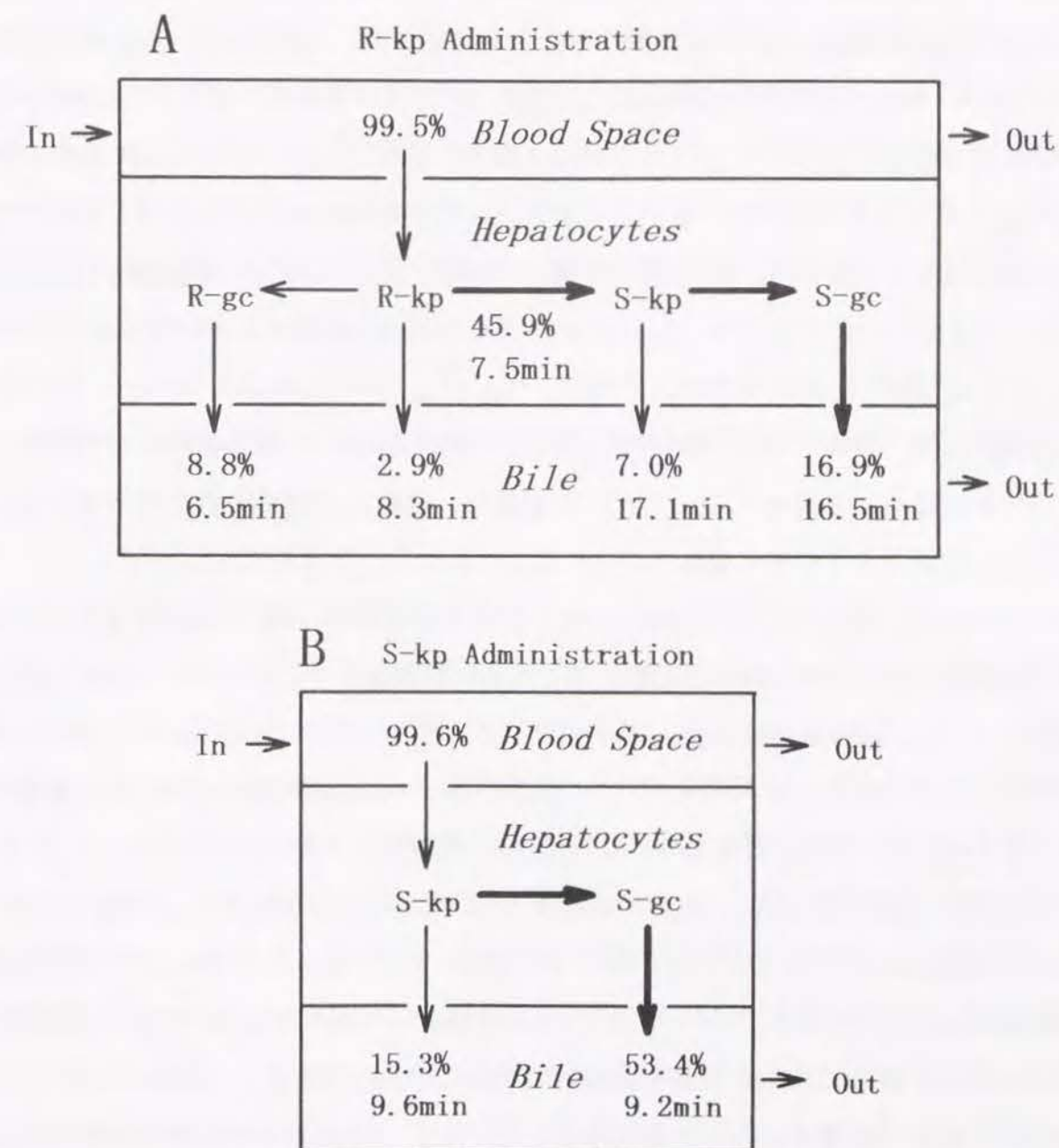


Fig. II-15 Schematic representation of biliary excretion and chiral inversion after (A) R- and (B) S-ketoprofen administration during single-pass through the rat liver. The bold arrows specify the fast processes.



Fig. II-15 は、ケトプロフェンの各光学対掌体投与後の肝局所動態の模式図を示している。キラル変換率  $F_{R \rightarrow S}$  及び平均異性化時間  $\bar{t}_{R \rightarrow S}$  は、それぞれ 46 % 及び 7.5 min と推定された。Fig. II-15 における太い矢印は、上述した速い過程を表している。一方、相対分散比  $\sigma_{\text{bile}}^2 / \bar{t}_{\text{bile}}^2$  は、肝組織に取り込まれてから胆汁中に排泄されるまでの薬物の種々の速度過程の機構に関する指標になると考えられる。角谷らは、薬物局所動態が well-stirred 過程で近似される場合  $\sigma_{\text{bile}}^2 / \bar{t}_{\text{bile}}^2$  は 1 に非常に近い値となり、mamillary 過程の場合  $\sigma_{\text{bile}}^2 / \bar{t}_{\text{bile}}^2$  は 1 より大きな値となり、catenary (consecutive) 過程の場合、 $\sigma_{\text{bile}}^2 / \bar{t}_{\text{bile}}^2$  は 1 より小さな値となることを報告している (38, 130)。Table II-8 における  $\sigma_{\text{bile}}^2 / \bar{t}_{\text{bile}}^2$  は全ての値が 1 よりも小さい値をとっていることから、肝組織への取り込みから胆汁中排泄までのケトプロフェンの移動は catenary 過程により記述できる。Table II-8 より R 体から変換された S 体の  $\sigma_{\text{bile}}^2 / \bar{t}_{\text{bile}}^2$  は S 体投与後の S 体自身の  $\sigma_{\text{bile}}^2 / \bar{t}_{\text{bile}}^2$  と比べてより小さい値となっている。変換された S 体のグルクロン酸抱合体についても同様のことが言える。これらの結果は、連続的な過程の数が増えるに従って  $\sigma_{\text{bile}}^2 / \bar{t}_{\text{bile}}^2$  の値がより小さくなるという予測と一致している (130, 131)。

ケトプロフェンはアルブミンと非常に強く結合する (132)。本節では、ケトプロフェンの肝局所動態に及ぼす蛋白結合の影響を除くために、灌流液中にアルブミンを含まない系で実験を行った。結合型薬物が細胞膜を通過することは一般的に困難であり、灌流液中にアルブミンが存在するとケトプロフェンの肝静脈側への溶出濃度推移にかなりの影響を及ぼすと考えられる。即ち、肝通過率  $F_H$  が極端に増加すると考えられる。

ラットの肝一回通過の際に、R 体の約半分が S 体にキラル変換され、肝臓における平均異性化時間は約 7.5 分であった。ケトプロフェンの R 体から S 体への一方向性のキラル変換だけが立体特異的であり、これ以外の肝組織への取り込みや胆汁排中への排泄は立体非特異的であった。肝臓では一方向性の代謝的異性化が起こり、大部分がグルクロン酸抱合後に胆汁中排泄されることが明らかとなった。光学異性体間の動態特性の相違は、異性化における立体選択性に起因することがわかった。本節に示した、モデル非依存的な局所モーメント解析は、複雑な薬物速度論モデルを用いなくても局所胆汁排泄や代謝過程を簡便に評価することができる。

全身系における薬物動態が腸肝循環を示す場合、血中濃度推移から得られる情報には体循環での動態特性のみならず胆汁排泄後の消化管再吸収による局所動態も反映する。腸肝循環を考慮した動態を従来のコンパートメントモデルで解析することは困難であるので、ネットワーク理論に基づいた再循環モデルによるラプラス次元の式を誘導して、高速ラプラス逆変換による非線型最小二乗法と組み合わせた腸肝循環解析法を構築した。さらに、定速注入時における血中濃度推移と胆汁中排泄より腸肝循環の局所モーメント特性値を推定する方法を確立した。次に、代謝過程を含んだ腸肝循環については、血漿中濃度推移と胆汁中排泄経過の局所モーメント値を用いてデコンボリューション計算するモデル非依存解析法を構築した。体内における代謝過程と腸肝循環過程を分離評価し、腸管循環特性が体内動態に及ぼす影響を定量的に評価した。

### 第 1 節 再循環理論に基づく定速注入時の全身系薬物動態における腸管循環特性と胆汁中排泄の評価

多くの薬物が有意な腸肝循環現象を示すことが知られている (133-140)。しかし、AUC (139-144) や MRT (145) に及ぼす腸肝循環の影響を取り扱ったいくつかの理論的な研究は、静脈内急速投与後の薬物血中濃度推移の考察のみに限定されている。近年、山岡らは急速投与後の薬物の腸肝循環動態を記述するための再循環概念に基づく一般的な理論を薬物動態学の分野に導入し、この理論から誘導されたラプラス次元のモデル式をラットにおけるセフィキシムの腸肝循環過程の評価に適用した (146)。ラプラス次元の虚数解を逆変換して時間次元の解析解を得ることは数学的に困難なので、MULTI (FILT) を用いて観測された濃度データに対してラプラス次元の式のままで当てはめ計算を実行し、腸肝循環特性を表すモデルパラメータを推定した。本節では、薬物定速注入後の血漿中濃度の時間経過から腸肝循環を評価するために、再循環概念に基づく元来のラプラス次元の理論式を拡張した。また、定速注入後の胆汁中累積排泄量から排泄率及び平均排泄時間を評価するために、漸近線を線形回帰する簡便な解析法を構築した。明確な腸肝循環特性を有するセフィキシム (146) をモデル薬物として、通常のラット及び胆管カニューレにより腸肝循環



を阻止したラットを用いた定速注入による全身動態実験を行い、得られた血漿中濃度推移と胆汁中排泄経過について本解析法を適用して腸肝循環特性を表す腸肝循環率および平均循環時間を分離評価し、併せて全身系モーメントとの関連も整理した。

### 1-1. 定速注入時における薬物の腸肝循環を評価するための再循環モデル

薬物の腸肝循環を取り扱うために導入された再循環モデルについては、薬物急速静注後の理論式に関する詳細が既に報告されており(146)、このモデルは Shepard らによって提案されている腸肝循環を組み込んだ複雑なコンパートメントモデル(134-136, 143, 145)を包括したより一般的なものである。Fig. III-1 は、腸肝循環が再循環過程として表現されるという概念図である(19)。

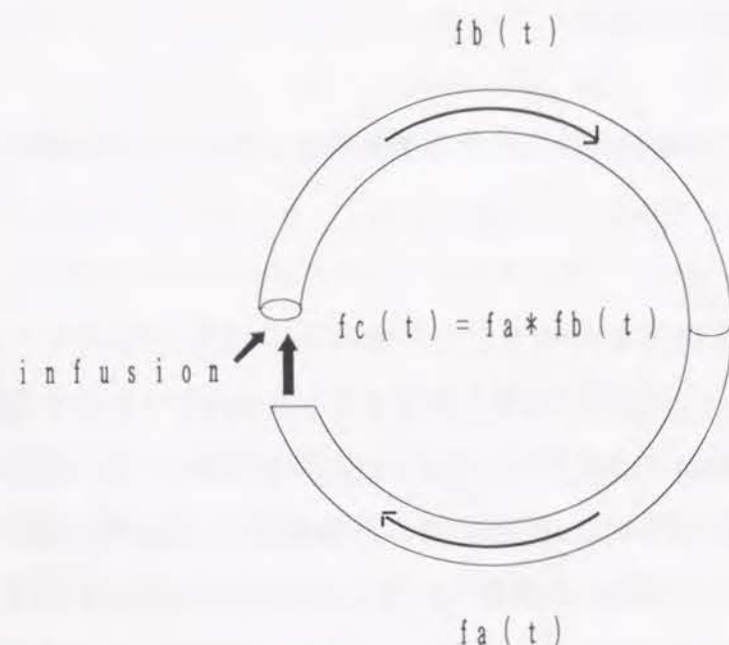


Fig. III-1 The concept of recirculatory processes.  $f_a(t)$  is weight function for the process outside the body through the intestinal tract.  $f_b(t)$  is weight function for the process inside the body through blood circulation system.  $f_c(t)$  is weight function for a single pass of EHC. Continuous infusion administration is represented by infusion.

Fig. III-1 において、 $f_a(t)$  及び  $f_b(t)$  は、それぞれ消化管内を通る体外の過程を表す重み関数及び血液循環系を通る体内の過程を表す重み関数である。ここでは、数式上の便宜さのために胆管及び門脈系を通過する過程を“体外”として扱っているため、 $f_a(t)$  は

多くの複雑な速度過程を内包することに注意する必要がある(140, 145)。また、この再循環モデルでは線形条件を仮定している。再循環概念に基づいた薬物急速静注後のラプラス次元の理論式は、以下の(III-1)式で与えられる(146)。

$$\tilde{C}_{p,iv}(s) = \frac{D_{iv}}{CL_b} \cdot \frac{\tilde{f}_b(s)}{1 - \tilde{f}_c(s)} \quad (\text{III-1})$$

ここで、 $D_{iv}$  は投与量、 $CL_b$  は胆汁排泄クリアランス、 $\tilde{f}_b(s)$  は体循環から胆汁中への排泄過程を表す伝達関数、 $\tilde{f}_c(s) (= \tilde{f}_a(s) \cdot \tilde{f}_b(s))$  は腸肝循環一周に対する一回通過の伝達関数であり、 $f_c(t)$  は  $f_a(t)$  と  $f_b(t)$  とのたたみこみ積分(コンボリューション)によって与えられる。薬物は腎排泄や代謝等の他の経路からも消失するので、 $CL_b$  は全身クリアランス  $CL^1$  よりも当然小さい値となる。一方、薬物が定速注入により持続投与される場合には、血漿中濃度推移に対するラプラス変換式は、以下の(III-2)式で与えられる。

$$\tilde{C}_{p,inf}(s) = \frac{R}{s} \frac{1}{CL_b} \cdot \frac{\tilde{f}_b(s)}{1 - \tilde{f}_c(s)} \quad (\text{III-2})$$

ここで、 $R$  は注入速度である。消化管からの薬物の再吸収が、阻害剤や胆管カニューレによって阻止されると、 $\tilde{f}_c(s)$  を無視できるので(III-2)式は(III-3)式に変形される。

$$\tilde{C}_p^1(s) = \frac{R}{s} \frac{1}{CL_b} \cdot \tilde{f}_b(s) \quad (\text{III-3})$$

ここで、 $\tilde{C}_p^1(s)$  は腸肝循環が阻止されたときの血漿中濃度推移のラプラス変換形であり、 $1$  は一回通過系を明記したものである。

### 1-2. 持続注入時の腸肝循環特性を表す局所モーメントと全身系モーメントとの関係

定速持続注入の場合、血漿中定常状態濃度  $C_{p,ss}$  とラプラス変換式との間には、極限值定理に基づいた以下の(III-4)式が成立する(147)。



$$C_{p,ss} = \lim_{s \rightarrow 0} s \cdot \tilde{C}_{p,inf}(s) \quad (\text{III-4})$$

さらに、平均滞留時間 MRT は以下の(III-5)式により評価できる(148)。

$$\text{MRT}_{inf} = \frac{1}{C_{p,ss}} \int_0^{\infty} \{C_{p,ss} - C_{p,inf}(t)\} dt \quad (\text{III-5})$$

MRT はラプラス次元の式とモーメント特性値との関係(37)を考慮すると、(III-5)式から(III-6)式が誘導される。

$$\text{MRT}_{inf} = \frac{1}{C_{p,ss}} \lim_{s \rightarrow 0} \frac{C_{p,ss} - s \cdot \tilde{C}_{p,inf}(s)}{s} \quad (\text{III-6})$$

一方、局所モーメントと伝達関数との間には以下の関係がある(37, 38)。

$$F_i = \lim_{s \rightarrow 0} \tilde{f}_i(s) \quad (\text{III-7})$$

$$\bar{t}_i = \lim_{s \rightarrow 0} -\frac{d}{ds} \ln \tilde{f}_i(s) \quad (\text{III-8})$$

ここで、 $F_i$  及び  $\bar{t}_i$  は、それぞれ重み関数  $f_i(t)$  の 0 次及び 1 次モーメントであり、局所動態過程における回収率および平均通過時間を表す。

(III-7)式及び(III-8)式を考慮して、(III-2)式を(III-4)式及び(III-6)式に代入すると、全身系モーメントと局所モーメントとの間に以下の関係が導かれる。

$$C_{p,ss} = \frac{R}{CL_b} \cdot \frac{F_b}{1-F_c} = \frac{R}{CL^1} \cdot \frac{1}{1-F_c} \quad (\text{III-9})$$

$$\text{MRT}_{inf} = \bar{t}_b + \bar{t}_c \cdot \frac{F_c}{1-F_c} \quad (\text{III-10})$$

ここで、 $CL^1 (= CL_b/F_b)$  は腸肝循環が阻止されたときの全身クリアランス、 $F_b$  及び  $\bar{t}_b$  はそれぞれ体循環から胆汁中への回収率及び平均通過時間、 $F_c$  及び  $\bar{t}_c$  は腸肝循環を一回通過する際の回収率及び平均循環時間である。(III-10)式は急速静注時の式と同じになる。

(III-7)式及び(III-8)式に  $\tilde{f}_c(s) (= \tilde{f}_a(s) \cdot \tilde{f}_b(s))$  を代入すると以下の(III-11)式及び(III-12)式が得られる。

$$F_c = F_a \cdot F_b \quad (\text{III-11})$$

$$\bar{t}_c = \bar{t}_a + \bar{t}_b \quad (\text{III-12})$$

ここで、 $F_a$  及び  $\bar{t}_a$  は、それぞれ薬物が総胆管へ排泄されてから消化管及び肝臓を通過して体循環へ戻るまでの回収率及び平均通過時間である。従って、前述したように  $\bar{t}_a$  は消化管から体循環までの吸収だけではなく、胆管の入口から消化管(ラットでは直接十二指腸に排泄される)へ排泄されるまでの過程も含んでいる。

腸肝循環が阻止された場合、(III-9)式及び(III-10)式はそれぞれ(III-13)式及び(III-14)式に変形される。

$$C_{p,ss}^1 = \frac{R}{CL^1} \quad (\text{III-13})$$

$$\text{MRT}^1 = \bar{t}_b \quad (\text{III-14})$$

一方、全身クリアランスと定常状態における体内薬物量は以下の式で与えられる。

$$CL = \frac{R}{C_{p,ss}} \quad (\text{III-15})$$

$$A_{ss} = \int_0^{\infty} \{R - CL \cdot C_{p,inf}(t)\} dt = CL \int_0^{\infty} \{C_{p,ss} - C_{p,inf}(t)\} dt \quad (\text{III-16})$$

定常状態分布容積  $V_{d,ss}$  は  $A_{ss}$  を  $C_{p,ss}$  で除することにより与えられるので(149)、



(III-5)式を考慮すると以下の(III-17)式が誘導される。

$$V_{d,ss} = \frac{CL}{C_{p,ss}} \int_0^{\infty} [C_{p,ss} - C_{p,inf}(t)] dt = CL \cdot MRT_{inf} \quad (III-17)$$

(III-9)式を(III-15)式に、(III-10)式を(III-17)式にそれぞれ代入すると、以下のよう  
にクリアランス及び分布容積と局所モーメントとが結びつく。

$$CL = CL^1 \cdot (1 - F_c) \quad (III-18)$$

$$V_{d,ss} = CL^1 \cdot \{\bar{t}_b \cdot (1 - F_c) + \bar{t}_c \cdot F_c\} = CL^1 \cdot (\bar{t}_b + \bar{t}_a \cdot F_c) \quad (III-19)$$

腸肝循環が阻止された場合には、(III-19)式は通常の(III-20)式に変形される。

$$V_{d,ss}^1 = CL^1 \cdot \bar{t}_b = CL^1 \cdot MRT^1 \quad (III-20)$$

(III-18)式～(III-20)式は、急速静注時の式と同じになる。

### 1-3. 持続注入時の胆汁中累積排泄量と局所モーメントとの関係

薬物が体内から胆汁中へ消失する際に、血液と胆汁との間を速度論的に分離する中間コンパートメントが存在しない場合は、以下の関係式が成り立つ。

$$\frac{dX_b(t)}{dt} = CL_b \cdot C_p^1(t) \quad (III-21)$$

ここで  $dX_b(t)/dt$  は胆汁排泄速度の時間推移、 $X_b(t)$  は累積排泄量の時間経過である。  
胆管カニューレにより胆汁が経時的に採取される場合は、腸肝循環は当然阻止されている。  
(III-21)式のラプラス変換形は、以下の式で与えられる。

$$s \cdot \tilde{X}_b(s) = CL_b \cdot \tilde{C}_p^1(s) \quad (III-22)$$

(III-3)式を(III-22)式に代入して整理すると、以下の式が得られる。

$$\tilde{X}_b(s) = \frac{CL_b}{s} \cdot \tilde{C}_p^1(s) = \frac{R}{s^2} \cdot \tilde{f}_b(s) \quad (III-23)$$

定常状態における胆汁排泄速度は、(III-23)式に極限值定理を適用することにより以下の式で表される。

$$\left\{ \frac{dX_b(t)}{dt} \right\}_{ss} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{dX_b(t)}{dt} = \lim_{s \rightarrow 0} s \cdot \{s \cdot \tilde{X}_b(s)\} = R \cdot F_b \quad (III-24)$$

(III-24)式から、 $X_b(t)$  は投与後初期には比較的緩やかな傾きで増加するが、傾きは次第に増加して最終的には  $R \cdot F_b$  の傾きを持つ漸近線に近づいていくことが予測できる。この漸近線を次のような関数で表す。

$$X_b^*(t) = R \cdot F_b \cdot (t - t_L) \quad (III-25)$$

ここで、 $R \cdot F_b$  と  $t_L$  はそれぞれ漸近線の傾きと時間軸の切片である(150)。ここでは、 $t_L$  を胆汁中排泄の lag time と呼ぶことにする。(III-25)式のラプラス変換形は以下の式で与えられる。

$$\tilde{X}_b^*(s) = R \cdot F_b \cdot \left( \frac{1}{s^2} - \frac{t_L}{s} \right) \quad (III-26)$$

実際の累積排泄量の時間経過曲線  $X_b(t)$  は、時間が経つにつれて漸近線  $X_b^*(t)$  に近づいていくので、以下の式が成り立つことになる。

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \{X_b(t) - X_b^*(t)\} = 0 \quad (III-27)$$



(III-27)式に極限值定理を適用することにより、以下の式が得られる。

$$\lim_{s \rightarrow 0} s \cdot \{ \tilde{X}_b(s) - \tilde{X}_b^*(s) \} = 0 \quad (\text{III-28})$$

(III-23)式及び(III-26)式を(III-28)式に代入して整理すると、胆汁中排泄の lag time  $t_L$  は、以下の(III-29)式で表される。

$$t_L = \frac{1}{RF_b} \lim_{s \rightarrow 0} \frac{RF_b - R\tilde{f}_b(s)}{s} = \frac{1}{F_b} \lim_{s \rightarrow 0} - \frac{d}{ds} \tilde{f}_b(s) = \bar{t}_b = \text{MRT}^I \quad (\text{III-29})$$

以上より、持続注入時においては胆汁中排泄の lag time  $t_L$  が、体内における平均滞留時間、即ちこの場合は体循環から胆汁中への平均通過時間に等しくなることが示された。

#### 1-4. 数値計算法

各群 4 匹からなるコントロール群及び腸肝循環阻止群の平均濃度データに対して、(III-2)式及び(III-3)式の同時最小二乗法による当てはめ計算を MULTI(FILT) を用いて第 2 節と同様に大型コンピュータ上で行い、モデルパラメータを推定した。当てはめ計算の際には、各伝達関数  $f_a(t)$  及び  $f_b(t)$  をそれぞれ gap time を有する mono-exponential、及び exponential の和に設定した(146)。

$$\tilde{f}_a(s) = e^{-t_0 \cdot s} \cdot F_a \frac{k_a}{s + k_a} \quad (\text{III-30})$$

$$\tilde{f}_b(s) = F_b \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{s + a_i} \bigg/ \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{a_i} \quad (\text{III-31})$$

ここで、 $t_0$  は吸収過程の gap time、 $F_a$  は胆管へ排泄されてから体循環へ戻るまでの回収率、 $k_a$  は一次吸収速度定数、 $F_b$  は体循環から胆汁中への回収率、 $A_i$  及び  $a_i$  は指数関数の係数及び指数、 $n$  は指数関数の項数である。(III-2)式及び(III-3)式に(III-30)式

及び(III-31)式を適用する際、以下の 4 つの候補を考慮して同時当てはめ計算を行った。最適なモデルの選択は、赤池情報量基準(AIC)の値により決定した(151)。

*Model 1:*  $f_b(t)$  は mono-exponential で与えられる。 $f_a(t)$  の gap time は無視する。

*Model 2:*  $f_b(t)$  は mono-exponential で与えられる。 $f_a(t)$  の gap time が存在する。

*Model 3:*  $f_b(t)$  は bi-exponential で与えられる。 $f_a(t)$  の gap time は無視する。

*Model 4:*  $f_b(t)$  は bi-exponential で与えられる。 $f_a(t)$  の gap time が存在する。

腸肝循環阻止群の各胆汁中累積排泄量については、血漿中濃度が定常状態濃度の 90 % 以上に到達している 2 時間以降の測定データに対して、(III-25)式の線形最小二乗法による回帰計算をパーソナルコンピュータ上で行い、パラメータを推定した。(III-25)式の漸近線の相関係数は、全てのデータ群に対して 0.999 以上であった。

#### 1-5. 動物実験法及び血漿中濃度定量法

Wistar 系雄性ラットを実験開始までの期間中は固形飼料と飲料水を自由に摂取させてから 16 時間絶食後、実験に使用した。各群 4 匹からなるコントロール群と胆管カニューレによる腸管循環阻止群に分けた。コントロール群には開腹手術を、腸肝循環阻止群には胆管カニューレ(PE-10, 夏目製作所株式会社)を施した。ペントバルビタール麻酔下で、薬液投与用として右大腿部静脈にカニューレ(0.5 mm i. d., 0.8 mm o. d.)を施した。等張緩衝液(2.54 %  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -4.41 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.4)に溶解させたセフィキシムを、37 °C に保ち 3 時間一定速度で持続注入した。注入速度は 10.8(±0.1 s. d.) mg/hr/kg に設定した。投与開始後 10、20、30、40、60、80、100、120、150、180 分後に頸静脈から各 0.2 ml の血液を採取した。遠心分離にて得られた各血漿試料 25  $\mu\text{l}$  に、25  $\mu\text{l}$  のリン酸緩衝液(pH 7.4)及び 450  $\mu\text{l}$  の 5 % トリクロロ酢酸を加えて攪拌した後、遠心分離にて得られた上清 10  $\mu\text{l}$  を HPLC に注入してセフィキシムの血漿中濃度を定量した。一方、投与開始後 0-30、30-60、60-90、90-120、120-150、150-180 分の間隔で胆汁を採取した。各胆汁試料 100  $\mu\text{l}$  に 900  $\mu\text{l}$  の等張緩衝液を加えて希釈した後、遠心分離にて得られた上清 10  $\mu\text{l}$  を HPLC に注入してセフィキシムの胆汁中濃度を定量した。HPLC システムは、第 2 章のものと同一である。



# 1-6. 血漿中濃度及び胆汁中排泄量に対する当てはめ計算結果と局所モーメント特性値

上述した 4 つの候補モデル群についての MULTI(FILT) による当てはめ計算の結果より得られた各 AIC の値は、それぞれ *Model 1*: 91.6、*Model 2*: 90.9、*Model 3*: 57.2、*Model 4*: 59.2 となり、*Model 3*( $f_a(t)$  は gap time のない mono-exponential で与えられ、 $f_b(t)$  は bi-exponential で与えられる)を最適モデルとして採用した。Fig. III-2 は、コントロール群及び腸肝循環阻止群における血漿中濃度の時間推移と *Model 3* の当てはめ結果を表す。腸肝循環阻止群の血漿中濃度推移は、投与開始後 30 分まではコントロール群とほぼ同じ推移であったが、その後はコントロール群と比較して低い値となった。

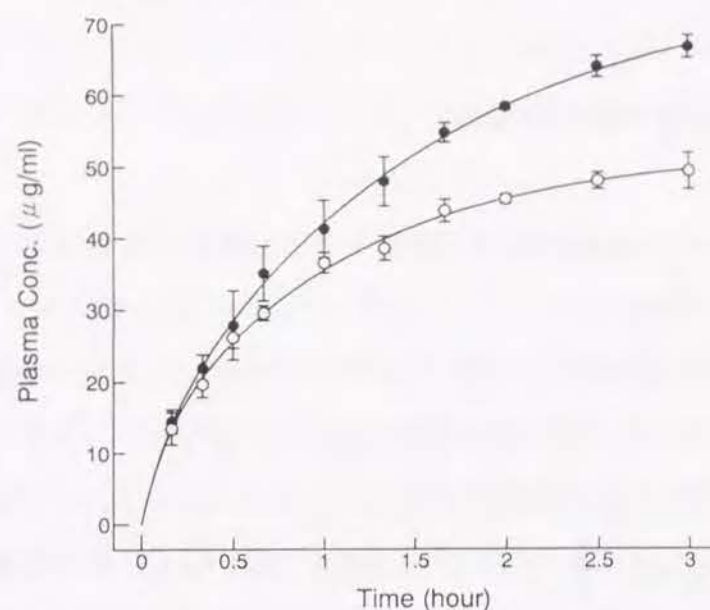


Fig. III-2 The time course of plasma concentration of cefixime after continuous infusion administration [●; control rats (n=4), ○; bile duct-cannulated rats (n=4)].

Table III-1 は、当てはめ計算により推定されたパラメータから計算した局所モーメント特性値を示す。腸肝循環率  $F_c$  は 31.1 %、後述する胆汁データから胆汁排泄率  $F_b$  は 40.7 % とそれぞれ推定された。体循環への再吸収率  $F_a$  は、これらの値から (III-11) 式より 76.4 % と算出された。また、胆汁中排泄の平均通過時間  $\bar{t}_b$  は 0.902 hr、再吸収過程における平均通過時間  $\bar{t}_a$  は gap time を有しない 0.0231 hr (=1.4 min) と推定された。平均腸肝循環時間  $\bar{t}_c$  は、これらの値から (III-12) 式より 0.925 hr と算出された。

Table III-2 は、局所モーメント特性値を各式に代入して算出した全身系モーメント特性値を示す。 $CL/CL^1$ 、 $MRT_{inf}/MRT^1$ 、及び  $V_{d,ss}/V_{d,ss}^1$  の各値は全身系体内動態に及ぼす腸肝循環の影響を表し、それぞれ 0.689、1.46、及び 1.01 と算出された。これより、未変化体で胆汁中排泄されて小腸から速やかに吸収されるセフィキシムについては (97, 98)、腸肝循環は全身クリアランス  $CL$  を減少させて平均滞留時間  $MRT$  を増加させるが、分布容積  $V_{d,ss}$  にはほとんど影響しないことが示された。

Table III-1

Local moment characteristics of cefixime calculated from plasma and bile data

$\bar{t}_a$	0.0231 hr
$\bar{t}_b$	0.902 hr
$\bar{t}_c$	0.925 hr
$F_a$	76.4 %
$F_b$	40.7 % ( $\pm 2.22$ SD)*
$F_c$	31.1 %
$CL^1$	0.207 L/kg/hr

\* Calculated from bile data (n=4)

Table III-2

Global moment characteristics calculated from local moment characteristics (a) for rats with laparotomy and (b) for bile duct-cannulated rats

	(a)	(b)
$Cp_{ss}$ (μg/ml)	75.9	52.3
$CL$ (L/hr/kg)	0.142	0.207
$MRT$ (hr)	1.32	0.902
$Vd_{ss}$ (L/kg)	0.187	0.187

一方、Fig. III-3 は、腸肝循環阻止群における胆汁中排泄速度の時間推移を表し、Fig. III-4 は、腸肝循環阻止群における胆汁中累積排泄量の各時間推移と (III-25) 式の漸近線の回帰結果を表す。Table III-3 は、(III-25) 式の漸近線の回帰結果から推定された胆汁中への回収率  $F_b$  と排泄の lag time  $t_L$  の値を示す。 $F_b$  及び  $t_L$  の値は、それぞれ 40.7 ( $\pm 2.2$  s. d.) % 及び 0.912 ( $\pm 0.105$  s. d.) hour と推定された。 $F_b$  の値はセフィキ



シム急速静注後のデータから推定された値(40.8 %)とほぼ一致しており(146)、一方、 $t_L$ の値は Table III-1 に示した血漿中濃度の当てはめ計算より推定された  $\bar{t}_b$  の値(0.902 hour)とほぼ一致した。これより、本節で記述した疑似定常状態における(III-25)式の漸近線を用いた  $F_b$  及び  $\bar{t}_b$  の評価法は、実際に有効であることが明らかとなった。また、セフィキシムの 全身系体内動態においては、血漿中濃度推移と胆汁中排泄経過との間に中間コンパートメントや遅れの過程は観測されないことも確認された。

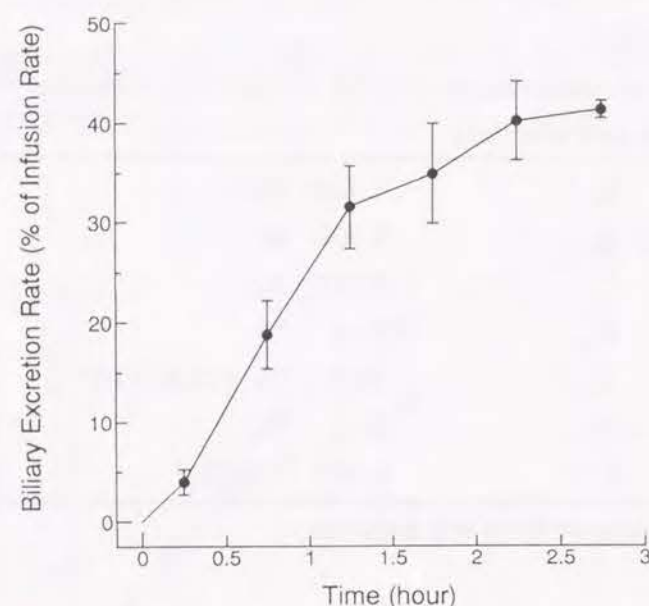


Fig. III-3 The time course of biliary excretion rate of cefixime after continuous infusion administration in bile duct-cannulated rats (n=4).

#### 1-7. 考察

薬物の静脈内定速持続注入法は、定常状態分布容積  $V_{d,ss}$  を推定するために用いられてきた(152, 153)。本節では腸肝循環を再循環過程として捉えることにより、定速持続注入後の血漿中濃度と胆汁中排泄の時間経過から、腸肝循環が薬物の濃度推移や全身系体内動態に及ぼす影響を解析し、腸肝循環特性を表す局所モーメント特性値を推定する評価法を確立した。本法は、従来の種々のコンパートメントモデル解析を包括しており、またモデル非依存的パラメータを推定できるより汎用性の高い解析法である。さらに、腸肝循環の有無に関わらず従来の全身系動態パラメータを持続投与において推定できる方法でもある。

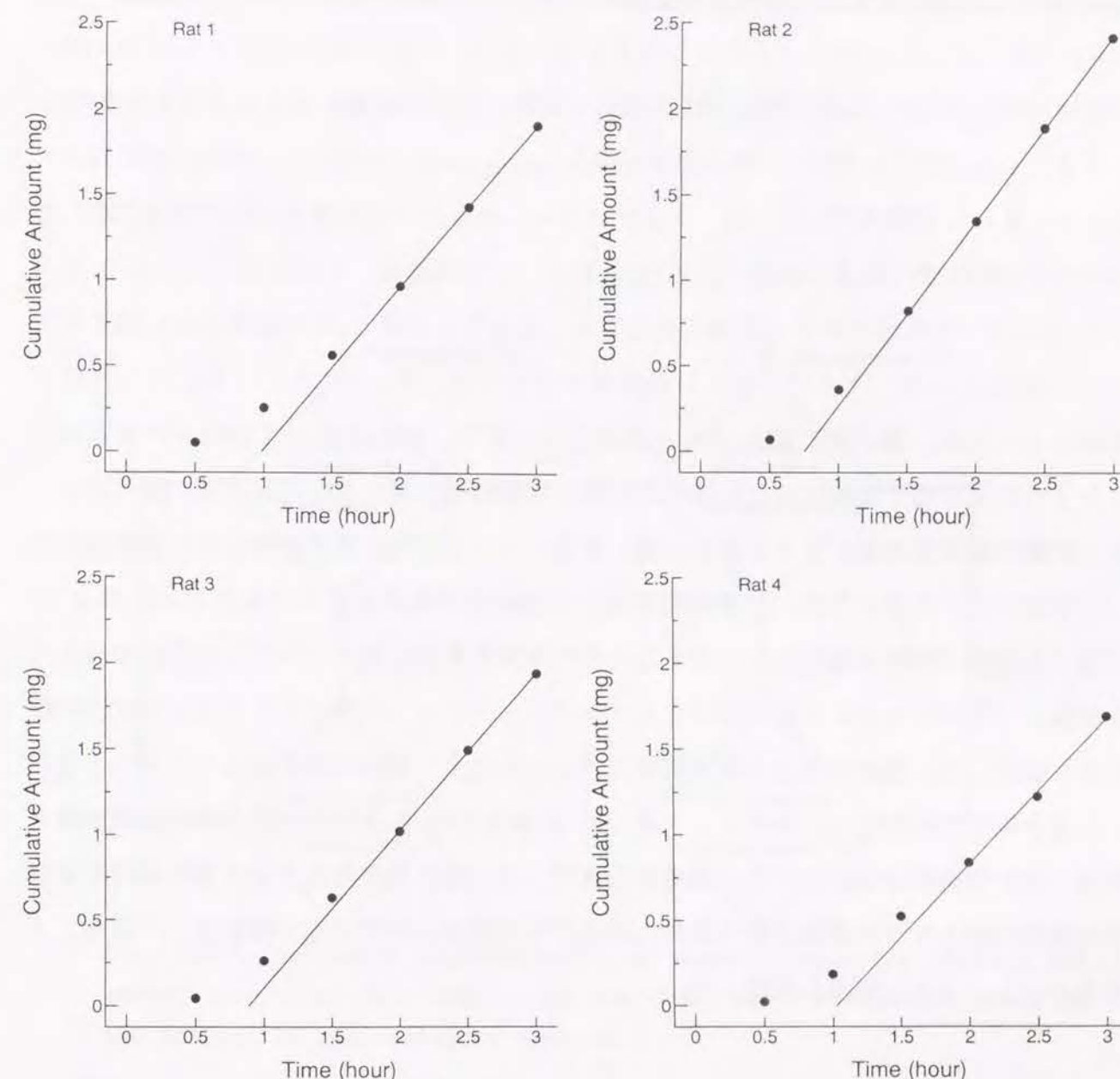


Fig. III-4 The time courses of the cumulative amount of drug excreted into the bile of bile duct-cacannulated rats (Rat 1~4), and the time courses fitted to the asymptote  $X_b(t)^*$ . The lines were obtained from the linear regression analysis of three data points after two hours.

Table III-3

Local moment characteristics of cefixime calculated from bile data of bile duct-cannulated rats using the asymptote method (n=4)

	Mean	SD
$F_b$ (%)	40.7	2.22
$\bar{t}_L (= \bar{t}_b)$ (hr)	0.912	0.105



## 第2節 代謝過程を含んだ薬物腸肝循環のモデル非依存的な局所モーメント解析

第2章で既に詳しく述べたように、非ステロイド系抗炎症薬として汎用されているケトプロフェンには、R体とS体の光学対掌体(enantiomer)が存在し、臨床治療においてはラセミ体として投与されている。ケトプロフェンの血漿中薬物濃度の時間推移に関しては両光学対掌体間で顕著な相違がある(125, 126)。この相違は、主に肝臓におけるR体からS体への一方向性のキラル変換に依るものであることが第2章の結果からも強く示唆された(154)。一方、ケトプロフェンの両光学対掌体は、ラットにおいて共にグルクロン酸抱合された後、選択的に胆汁中へと排泄されるので、腸肝循環の可能性が予測される。ケトプロフェン光学対掌体の立体選択的な腸肝循環動態に関する研究は非常に限られており、光学対掌体投与後のキラル変換と腸肝循環について同時に速度論解析した報告例はない。本節では、キラル変換の代謝過程を含んだ腸肝循環動態を評価するために、第1節で述べた薬物の腸肝循環動態を記述するための再循環概念に基づくラプラス次元の理論式を拡張し、局所モーメント値を用いたデコンボリューション計算によるモデル非依存的解析法を構築した。通常のラット及び胆管カニューレにより腸肝循環を阻止したラットを用いた全身動態実験を行い、ケトプロフェンのR体またはS体を急速静注後の血漿中濃度推移と胆汁中排泄経過について本解析法を適用して、腸肝循環特性を表す腸肝循環率及び平均循環時間とキラル変換を表す異性化率及び平均異性化時間とを分離評価し、併せて全身系モーメントとの関連も整理した。

### 2-1. 代謝過程を含んだ薬物の腸肝循環動態のモデル非依存的な局所モーメント解析

Fig. III-5 は、腸肝循環と一方向性のキラル変換とを同時に再循環過程として表現した概念図である。Fig. III-5 において、各重み関数が表す内容は Fig. III-1 と同様であり、R 及び S の上付き文字はそれぞれ R 体および S 体を表している。また、キラル変換を表す重み関数として  $f_{R \rightarrow S}(t)$  を定義した。再循環概念に基づいた薬物急速静注後のラプラス次元の理論式は、以下の(III-32)式で与えられる。

$$\tilde{C}_{p,iv}(s) = \frac{D_{iv}}{CL^1 \cdot F_b} \cdot \frac{\tilde{f}_b(s)}{1 - \tilde{f}_c(s)} \quad (\text{III-32})$$

(III-32)式は、(III-1)式を若干変形したものである。ここで、 $D_{iv}$  は静脈内投与量、 $CL^1 (= CL_b / F_b)$  は腸肝循環が阻止されたときの全身クリアランスである。消化管からの薬物の再吸収が阻止される場合  $\tilde{f}_c(s)$  を無視でき、(III-32)式は(III-33)式に変形される。

$$\tilde{C}_p^1(s) = \frac{D_{iv}}{CL^1 \cdot F_b} \cdot \tilde{f}_b(s) \quad (\text{III-33})$$

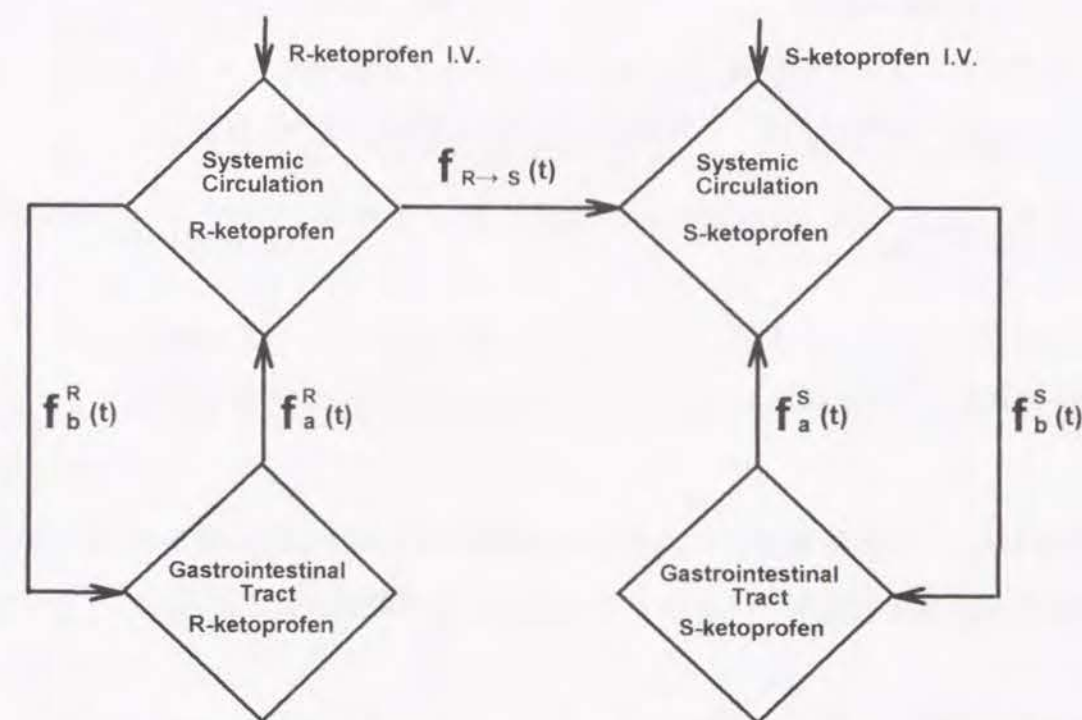


Fig. III-5 Schematic representation of enterohepatic circulation and chiral inversion after administration of R- and S-ketoprofen based on the concept of recirculatory process.

R 体投与後に変換された S 体のラプラス次元の理論式は、再循環概念に基づき一般的に以下の(III-34)式で与えられる。

$$\tilde{C}_{p,R \rightarrow S}(s) = \frac{D_{iv}^R}{CL^{1,S} \cdot F_b^S} \cdot \frac{\tilde{f}_b^S(s)}{1 - \tilde{f}_c^S(s)} \cdot \frac{\tilde{f}_{R \rightarrow S}(s)}{F_b^R} \cdot \frac{\tilde{f}_b^R(s)}{1 - \tilde{f}_c^R(s)} \quad (\text{III-34})$$

ここで  $\tilde{C}_{p,R \rightarrow S}(s)$  は R 体投与後に変換された S 体の血漿中濃度のラプラス変換形である。 $\tilde{f}_{R \rightarrow S}(s)$  は R 体から S 体へのキラル変換を表す伝達関数である。R 及び S の上付き文字はそれぞれ R 体および S 体を表している。消化管からの薬物の再吸収が阻止され



る場合、 $\tilde{f}_c(s)$  を無視できるので(III-34)式は(III-35)式に変形される。

$$\tilde{C}_{p,R \rightarrow S}^1(s) = \frac{D_{iv}^R}{CL^{1,S} \cdot F_b^S} \cdot \tilde{f}_b^S(s) \cdot \frac{\tilde{f}_{R \rightarrow S}(s)}{F_b^R} \cdot \tilde{f}_b^R(s) \quad (III-35)$$

ここで  $\tilde{C}_{p,R \rightarrow S}^1(s)$  は、腸肝循環を阻止した時の R 体投与後に変換された S 体の血漿中濃度のラプラス変換形である。

一方、全身系モーメント特性値(AUC、MRT)は、モーメントとラプラス次元の式との関係を考慮すると血漿中濃度のラプラス変換形  $\tilde{C}_p(s)$  に結びつけられる(37)。

$$AUC = \lim_{s \rightarrow 0} \tilde{C}_p(s) \quad (III-36)$$

$$MRT = \lim_{s \rightarrow 0} \frac{-d}{ds} \ln \tilde{C}_p(s) \quad (III-37)$$

(III-7)式及び(III-8)式を考慮して、(III-32)式を(III-36)式及び(III-37)式に代入すると、全身系モーメントと局所モーメントとの間に以下の関係が導かれる。

$$AUC = \frac{D_{iv}}{CL^1 \cdot F_b} \cdot \frac{F_b}{1 - F_c} = \frac{D_{iv}}{CL^1} \cdot \frac{1}{1 - F_c} \quad (III-38)$$

$$MRT_{inf} = \bar{t}_b + \bar{t}_c \cdot \frac{F_c}{1 - F_c} \quad (III-39)$$

ここで、 $F_b$  及び  $\bar{t}_b$  はそれぞれ体循環から胆汁中への回収率及び平均通過時間、 $F_c$  及び  $\bar{t}_c$  は腸肝循環を一回通過する際の回収率及び平均循環時間である。腸肝循環が阻止された場合、(III-38)式及び(III-39)式はそれぞれ(III-40)式及び(III-41)式に変形される。

$$AUC^1 = \frac{D_{iv}}{CL^1} \quad (III-40)$$

$$MRT^1 = \bar{t}_b \quad (III-41)$$

腸肝循環率  $F_c$  及び 平均循環時間  $\bar{t}_c$  は、(III-38)式～(III-41)式を結びつけて再整理することにより以下のように計算できる。

$$F_c = 1 - \frac{AUC^1}{AUC} \quad (III-42)$$

$$\bar{t}_c = \frac{AUC^1}{AUC - AUC^1} \cdot (MRT - MRT^1) \quad (III-43)$$

一方、全身クリアランス  $CL$  と定常状態分布容積  $V_{d,ss}$  は、(III-38)式及び(III-39)式から局所モーメントと結びついた第 1 節と同様の(III-18)式～(III-20)式で与えられる。

また、(III-7)式及び(III-8)式を考慮して、(III-34)式を(III-36)式及び(III-37)式に代入すると、変換された S 体の全身系モーメントと局所モーメントとの間に以下の関係が導かれる。

$$AUC_{R \rightarrow S} = \frac{D_{iv}^R}{CL^{1,S}} \cdot \frac{1}{1 - F_c^S} \cdot \frac{F_{R \rightarrow S}}{1 - F_c^R} \quad (III-44)$$

$$MRT_{R \rightarrow S} = MRT^S + \bar{t}_{R \rightarrow S} + MRT^R \quad (III-45)$$

ここで、 $AUC_{R \rightarrow S}$  及び  $MRT_{R \rightarrow S}$  は、R 体投与後に変換された S 体の全身系モーメント、 $F_{R \rightarrow S}$  及び  $\bar{t}_{R \rightarrow S}$  は、R 体から S 体への異性化率及び平均異性化時間である。腸肝循環が阻止される場合、(III-44)式及び(III-45)式は、それぞれ(III-46)式及び(III-47)式に変形される。

$$AUC_{R \rightarrow S}^1 = \frac{D_{iv}^R}{CL^{1,S}} \cdot F_{R \rightarrow S} \quad (III-46)$$

$$MRT_{R \rightarrow S}^1 = MRT^{1,S} + \bar{t}_{R \rightarrow S} + MRT^{1,R} \quad (III-47)$$



ここで、 $AUC_{R \rightarrow S}^I$  及び  $MRT_{R \rightarrow S}^I$  は、腸肝循環が阻止されたときの R 体投与後に変換された S 体の全身系モーメントである。(III-38)式及び(III-40)式を、それぞれ(III-44)式及び(III-46)式に結びつけると、R 体と S 体の投与量が等しいときには異性化に関する以下の式が誘導される。

$$\frac{AUC_{R \rightarrow S}}{AUC^S} = \frac{F_{R \rightarrow S}}{1 - F_c^R} \quad (III-48)$$

$$\frac{AUC_{R \rightarrow S}^I}{AUC_{I,S}^I} = F_{R \rightarrow S} \quad (III-49)$$

## 2-2. 数値計算法

ケトプロフェン光学対掌体の血漿中濃度の時間推移に対する全身系モーメント特性値 AUC 及び MRT は、第 1 章と同様にモデル非依存的解析法に基づいて計算した。即ち、実測点に対しては線形台形公式による積分計算を適用した(37)。初期濃度は、投与後初期の数点を mono-exponential に従って内挿することにより推定し、terminal phase に対しては最小二乗法により一次速度式に当てはめて無限時間まで外挿した値を算出した。また、CL 及び  $V_{d,ss}$  は AUC 及び MRT の値から計算した。一方、ケトプロフェン光学対掌体の未変化体及びグルクロン酸抱合体の胆汁中排泄の時間経過に対しても、第 2 章と同様にモデル非依存的解析法に基づいて局所モーメント特性値である胆汁排泄率  $F_{bile}$  及び平均胆汁排泄時間  $\bar{t}_{bile}$  を計算した(37)。血漿中濃度の場合と同様にして、実測点に対しては線形台形公式による積分計算を適用し、また terminal phase に対しては最小二乗法により一次速度式に当てはめて無限時間まで外挿した値を算出した。

## 2-3. 動物実験法及び血漿中濃度定量法

ケトプロフェンの光学対掌体は、第 2 章で述べた HPLC システムにより分析用光学分離カラム SUMICHIRAL OA-2500(4.6 mm i.d. x 250 mm、住化分析センター)を用いてラセミ体から R 体と S 体を分取した。両光学対掌体の純度は、同様の HPLC システムで定量

したところ 99% 以上であった。各光学対掌体の分取フラクションを集めて溶媒を除去後、生理食塩水に溶解させた後適当な濃度に調節して投与試料とした。ケトプロフェンの各光学対掌体の血漿中濃度及び胆汁中濃度は、第 2 章と同様のカラムスイッチング法を備えた HPLC システムにより定量した(128)。

Wistar 系雄性ラットを実験開始までの期間中は固形飼料と飲料水を自由に摂取させて 16 時間絶食後、実験に使用した。各群 4 匹からなるコントロール群と胆管カニキュレによる腸管循環阻止群に分けた。コントロール群には疑似開腹手術を、腸管循環阻止群には胆管カニキュレ(PE-10、夏目製作所株式会社)を施した。ペントバルビタール麻酔下で、生理食塩水に溶解させたケトプロフェン各光学対掌体を、37 °C に保ち右大腿部静脈から急速投与した。投与量は 0.1 mg/kg に設定した。投与開始後 5、15、30、45、60、90、120、150、180 分後に頸静脈から各 0.22 ml の血液を採取した。遠心分離にて得られた各血漿試料 100  $\mu$ l を直接 HPLC に注入してケトプロフェン光学対掌体の血漿中濃度を定量した。一方、投与開始後 0-15、15-30、30-45、45-60、60-80、80-100、100-120、120-150、150-180 分の間隔で胆汁を採取した。各胆汁試料 100  $\mu$ l に 300  $\mu$ l の生理食塩水を加えて希釈し、100  $\mu$ l を直接 HPLC に注入してケトプロフェン光学対掌体の胆汁中濃度を定量した。さらに、希釈した各胆汁試料 200  $\mu$ l に 1 M の NaOH 100  $\mu$ l を加えて攪拌し、室温で 30 分間加水分解処理を行った。1 M の HCl 100  $\mu$ l を加えて中和させた後、各試料 100  $\mu$ l を HPLC に注入した。アルカリ加水分解による未変化体の安定性を確認し(155)、加水分解処理した試料と無処理の試料との濃度差からグルクロン酸抱合体濃度を定量した。両光学対掌体の検量線の相関係数は、実験条件の濃度範囲(光学対掌体濃度として 0.025-2.0  $\mu$ g/ml)において 0.999 以上であった。

## 2-4. 血漿中濃度及び胆汁中排泄量の時間推移と腸肝循環によるモーメント値の変動

Fig. III-6a 及び Fig. III-6b は、ケトプロフェン R 体及び S 体投与後のコントロール群と腸管循環阻止群における血漿中濃度の時間推移を表す。両光学対掌体について、腸管循環阻止群の血漿中濃度推移は、投与開始後 30 分まではコントロール群とほぼ同じ推移であったが、その後はコントロール群と比較して低い値となり、両光学対掌体の濃度推移とも腸管循環により有意に延長した。また、腸管循環の有無に関わらず R 体と S 体



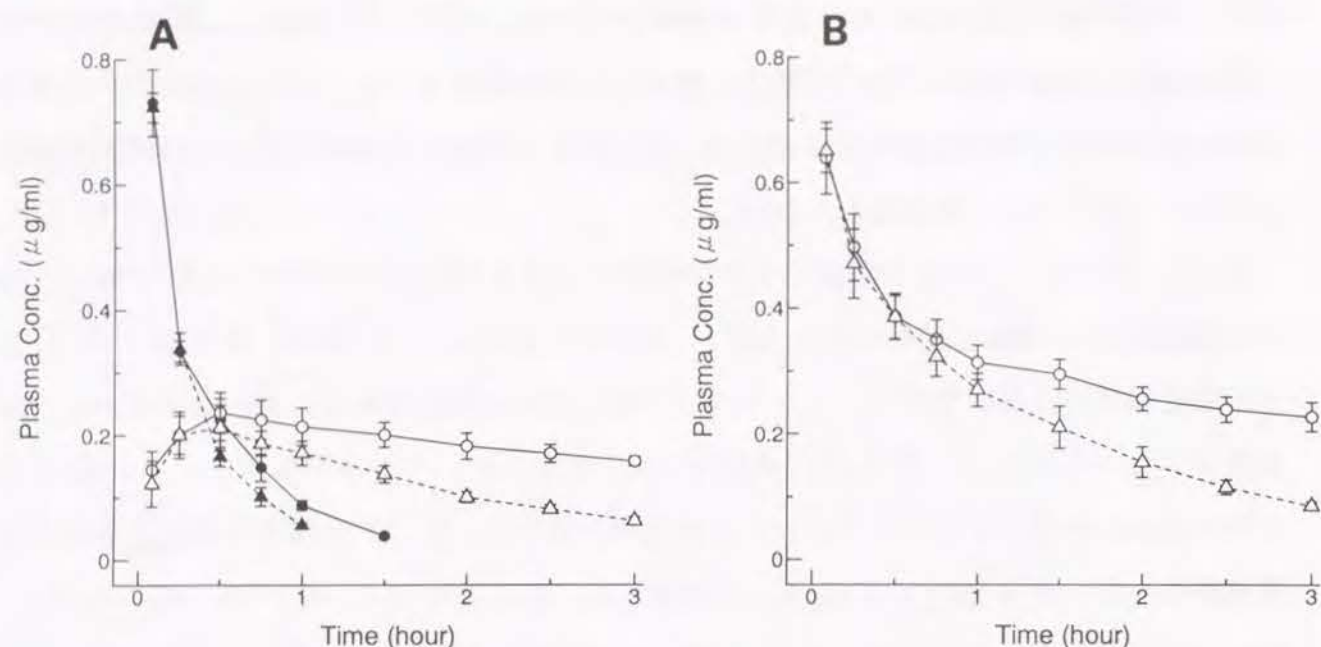


Fig. III-6 Plasma concentration vs. time plots of R- and S-ketoprofen after administration of (A) R- or (B) S-ketoprofen (Dose=0.1mg/kg). Error bars represent the S.D. for four rats (●; R-ketoprofen in control rats, ▲; R-ketoprofen in bile duct-cannulated rats, ○; S-ketoprofen in control rats, △; S-ketoprofen in bile duct-cannulated rats).

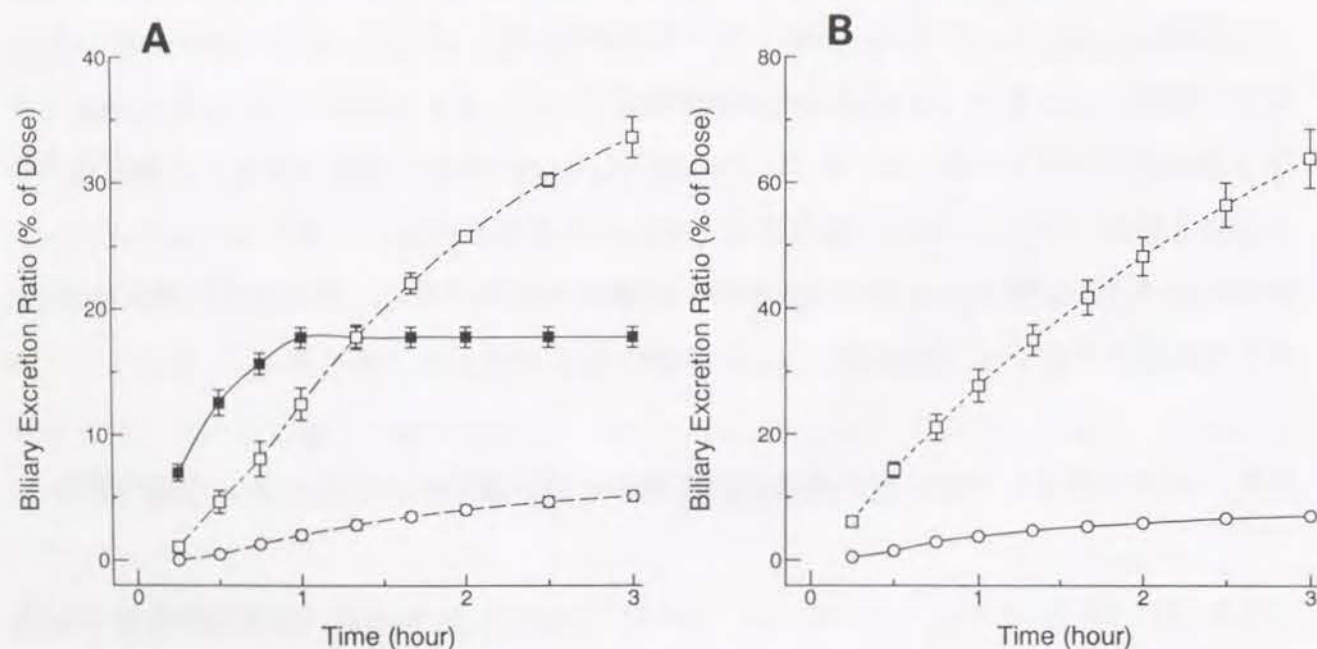


Fig. III-7 Biliary excretion ratio vs. time plots of R- and S-ketoprofen after administration of (A) R- or (B) S-ketoprofen in bile duct-cannulated rats (Dose=0.1mg/kg). Error bars represent the S.D. for four rats (■; R-conjugated, ○; S-unchanged, □; S-conjugated).

との間には濃度推移にかなりの違いが示された。一方、Fig. III-7a 及び Fig. III-7b は、ケトプロフェン R 体及び S 体投与後の腸肝循環阻止群における未変化体とグルクロン酸抱合体の胆汁中累積排泄率の時間推移を表す。第 2 章の局所実験の結果と同様に、R 体投与後に変換された S 体が観測され、胆汁中へグルクロン酸抱合体として選択的に排泄されることが示された。また、S 体投与後の R 体への変換は、第 2 章と同様に観測されなかった。

Table III-4 及び Table III-5 は、モデル非依存的方法により算出した全身系モーメント特性値を示す。両光学対掌体の間には、モーメントの値にかなりの相違が示された。R 体の  $CL^1$  は S 体の 2.7 倍であり、S 体の  $MRT^1$  は R 体の 4.9 倍である。従って、S 体の  $V_{d,ss}^1$  は R 体の 1.8 倍である。 $CL/CL^1$ 、 $MRT_{inf}/MRT^1$ 、及び  $V_{d,ss}/V_{d,ss}^1$  の各値は全身系体内動態に及ぼす腸肝循環の影響を表し、R 体ではそれぞれ 0.847、1.37、及び 1.17 と算出された。一方、S 体ではそれぞれ 0.363、3.72、及び 1.35 と算出された。これより、ケトプロフェンの両光学対掌体については、腸肝循環は全身クリアランス  $CL$  を減少させるが、平均滞留時間  $MRT$  を増加させ、分布容積  $V_{d,ss}$  をも増加させることが示された。

Table III-4  
Global Moments of Plasma Concentration Profiles of R- and S-Ketoprofen  
Calculated by Numerical Integration after Administration of R-Ketoprofen

	With EHC (n=4)	Without EHC (n=4)
<b>R-ketoprofen</b>		
AUC ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{hr}$ )	$0.376\pm0.014$	$0.318\pm0.020$
MRT (hr)	$0.477\pm0.047$	$0.348\pm0.023$
CL ( $\text{L/hr/kg}$ )	$0.266\pm0.010$	$0.314\pm0.019$
$V_{d,ss}$ ( $\text{L/kg}$ )	$0.127\pm0.015$	$0.109\pm0.010$
<b>S-ketoprofen</b>		
AUC ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{hr}$ )	$1.68\pm0.05$	$0.521\pm0.023$
MRT (hr)	$6.89\pm0.38$	$2.14\pm0.22$

Results are reported as mean $\pm$ standard deviation.



Table III-5

Global Moments of Plasma Concentration Profiles of S-Ketoprofen  
Calculated by Numerical Integration after Administration of S-Ketoprofen

	With EHC (n=4)	Without EHC (n=4)
<b>S-ketoprofen</b>		
AUC ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{hr}$ )	2.40 $\pm$ 0.12	0.875 $\pm$ 0.066
MRT (hr)	6.36 $\pm$ 0.26	1.71 $\pm$ 0.19
CL (L/hr/kg)	0.0417 $\pm$ 0.0021	0.115 $\pm$ 0.010
Vd <sub>ss</sub> (L/kg)	0.265 $\pm$ 0.016	0.197 $\pm$ 0.030

Results are reported as mean $\pm$ standard deviation.

R-ketoprofen was not detected in the plasma after S-ketoprofen administration.

Table III-6 及び Table III-7 は、モデル非依存的な方法により算出した胆汁排泄の局所モーメント特性値を示す。R 体のグルクロン酸抱合体の胆汁中への排泄率  $F_b$  及び平均排泄時間  $\bar{t}_b$  の値は、それぞれ 17.7 % 及び 0.38 hr と推定された。R 体の未変化体は胆汁中には観測されなかった。また、R 体から変換された S 体未変化体の  $F_b$  及び  $\bar{t}_b$  の値は、それぞれ 6.3 % 及び 1.9 hr と推定され、そのグルクロン酸抱合体の  $F_b$  及び  $\bar{t}_b$  の値は、それぞれ 39.7 % 及び 1.9 hr と推定された。R 体から変換された S 体の  $F_b$  及び  $\bar{t}_b$  の値は、それぞれの R 体の値と比較して有意に大きな値であった。

一方、S 体自身の未変化体の  $F_b$  及び  $\bar{t}_b$  の値は、それぞれ 8.3 % 及び 1.6 hr と推定され、そのグルクロン酸抱合体の  $F_b$  及び  $\bar{t}_b$  の値は、それぞれ 67.5 % 及び 1.7 hr と推定された。S 体の未変化体とグルクロン酸抱合体との間には  $\bar{t}_b$  の値に有意な差は認められなかった。グルクロン酸抱合体の  $\bar{t}_b$  が親化合物の  $\bar{t}_b$  とほぼ等しいという事実は、第 2 章の局所動態実験の結果と同様に、グルクロン酸抱合反応並びにグルクロン酸抱合体自身の胆汁排泄が非常に速い過程であることを証明するものである。また、胆汁中排泄データから計算された両光学対掌体の  $\bar{t}_b$  の値は、それぞれ Table III-4 及び Table III-5 に示した血漿中濃度から計算された  $\bar{t}_b$  の値とほぼ一致しており、ケトプロフェンの両光学対掌体の全身系体内動態においては、血漿中濃度推移と胆汁中排泄経過との間に中間コンパートメントや遅れの過程は観測されないことも確認された。

Table III-6

Local Moments of Biliary Excretion Profiles of R- and S-Ketoprofen and  
those glucuronides Calculated by Numerical Integration after Administration  
of R-Ketoprofen

	Unchanged (n=4)	Conjugated (n=4)
<b>R-ketoprofen</b>		
$F_b$ (%)	not detected	17.7 $\pm$ 0.8
$\bar{t}_b$ (hr)	not detected	0.379 $\pm$ 0.015
<b>S-ketoprofen</b>		
$F_b$ (%)	6.26 $\pm$ 0.60	39.7 $\pm$ 2.3
$\bar{t}_b$ (hr)	1.93 $\pm$ 0.07	1.93 $\pm$ 0.08

Results are reported as mean $\pm$ standard deviation.

Table III-7

Local Moments of Biliary Excretion Profiles of S-Ketoprofen and its  
glucuronide Calculated by Numerical Integration after Administration  
of S-Ketoprofen

	Unchanged	Conjugated
<b>S-ketoprofen</b>		
$F_b$ (%)	8.34 $\pm$ 0.20	67.5 $\pm$ 2.8
$\bar{t}_b$ (hr)	1.64 $\pm$ 0.04	1.74 $\pm$ 0.10

Results are reported as mean $\pm$ standard deviation.

R-ketoprofen was not detected in the bile after S-ketoprofen administration.

## 2-5. 局所モーメント特性値による立体選択的な腸肝循環と体内異性化の分離評価

Table III-8 は、全身系モーメントの値を対応する局所モーメントとの関係式に代入して計算した局所モーメント特性値を示す。また、それぞれの値を Fig. III-8 にまとめた。腸肝循環率  $F_c$  は R 体では 15.4 %、S 体では 63.6 % と推定された。胆汁中への総排泄率は R 体では 17.7 %、S 体では 75.8 % と推定された。体循環への再吸収率  $F_a$  は、これらの値から R 体では 87.0 %、S 体では 83.8 % と算出された。また、再吸収過程における平均通過時間  $\bar{t}_a$  は R 体では 0.361 hr、S 体では 0.953 hr と推定された。



Table III-8

Local Moments of R- and S-Ketoprofen Calculated from Global Moment  
Characteristics of Plasma Concentration and Biliary Excretion Data

Local Moments	R-ketoprofen	S-ketoprofen
$\bar{t}_a$ (hr)	0.361	0.953
$\bar{t}_b$ (hr)	0.348 ( $\pm 0.023$ )	1.71 ( $\pm 0.19$ )
$\bar{t}_c$ (hr)	0.709	2.66
$F_a$ (%)	87.0	83.8
$F_b$ (%)	17.7 ( $\pm 0.8$ )	75.8 ( $\pm 2.9$ )
$F_c$ (%)	15.4	63.6
$F_{R \rightarrow S}$ (%)	59.5	
$\bar{t}_{R \rightarrow S}$ (hr)	0.082	

Numbers in parentheses represent mean  $\pm$  standard deviation.

$F_b$  was calculated from the bile data in Table II.

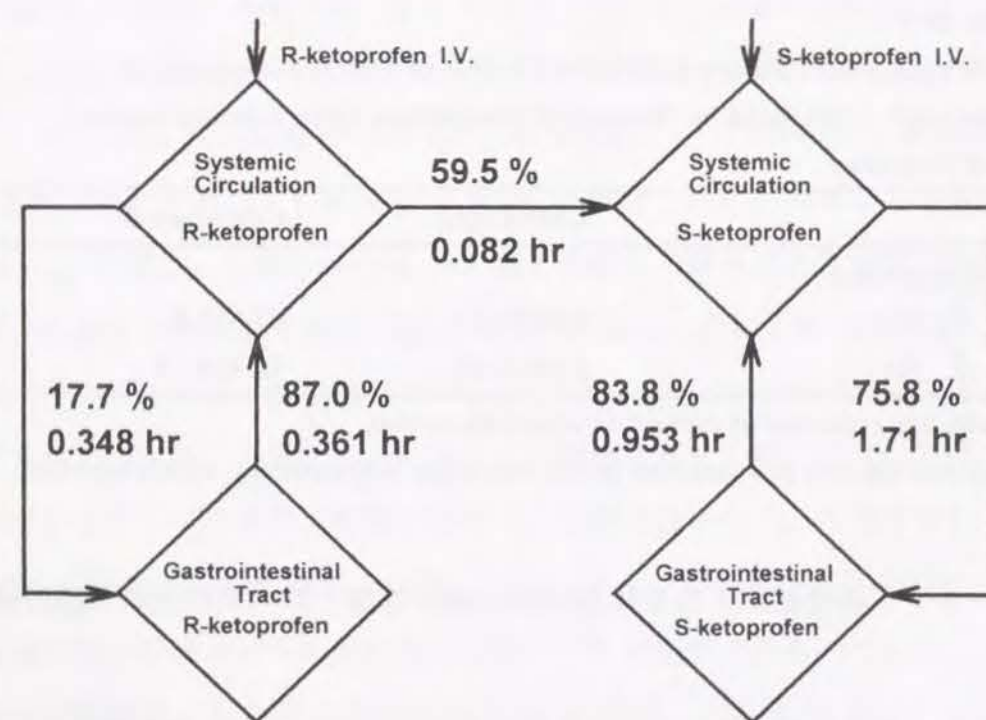


Fig. III-8 Local moments of enterohepatic circulation and chiral inversion after administration of R- and S-ketoprofen.

異性化率  $F_{R \rightarrow S}$  は(III-49)式から 59.5 % と算出され、平均異性化時間  $\bar{t}_{R \rightarrow S}$  は(III-47)式から 4.9 min と算出された。両光学対掌体の間で、 $F_a$  を除く全ての局所モー

メント特性値にかなりの差違が示され、立体選択性が認められた。S 体の  $F_b$  及び  $F_c$  は、それぞれ R 体の 4.3 倍、4.1 倍であった。また、S 体の  $\bar{t}_a$  及び  $\bar{t}_b$  は、それぞれ R 体の 2.6 倍、4.9 倍であった。従って、S 体の平均腸肝循環時間  $\bar{t}_c$  は、R 体の 3.8 倍であった。

## 2-6. 考察

S 体の  $\bar{t}_a$  は、R 体の  $\bar{t}_a$  の 4.9 倍であった。ケトプロフェンは大部分がグルクロン酸抱合体として胆汁中へ排泄される。グルクロン酸抱合体のまま消化管から吸収されることは困難なので、再吸収される前に未変化体に加水分解されると考えられる。Volland らは、フェノプロフェンの R 体のグルクロン酸抱合体が S 体のグルクロン酸抱合体と比較してかなり速い速度で加水分解されることを報告している(156)。従って、S 体のより大きな  $\bar{t}_a$  の値は、消化管におけるグルクロン酸抱合体の加水分解速度の立体選択性に依ることが示唆される。

ケトプロフェンの光学対掌体の血漿中濃度推移と胆汁中排泄から、局所モーメント特性値のデコンボリューション計算に基づくモデル非依存的分析法を構築した。本法により、体内における R 体から S 体への代謝的異性化は大部分が肝臓でおこることが示され、この異性化に及ぼす腸管循環の影響を定量的に評価することができた。光学対掌体間の血中動態特性の相違は、肝内異性化と胆汁排泄過程における立体選択性に起因することが明らかとなった。



## 結 論

以上、著者は薬物の肝臓内局所動態を定量的に把握するために、局所モーメント解析に基づく評価法を確立することを目的として本研究を行い、次の結論を得た。

### (1) 肝灌流系における薬物の組織移行と代謝過程の局所モーメント解析

肝灌流系における薬物の静脈側溶出濃度の解析に広く適用されている非平衡拡散モデルの薬物速度論パラメータと肝局所モーメント特性値との関係を整理することにより、溶出濃度の時間推移から分布、消失といった薬物の組織移行を評価する局所モーメント解析法を新たに確立した。これより、肝消失が極端に大きい薬物を除けば、通過率は消失を、平均通過時間は分布を、相対分散比は血液部での拡散と組織への非平衡分配の総和をそれぞれ表すことが明らかとなった。さらに、局所モーメント解析法を肝障害時における局所動態変動の評価に適用し、正常肝を有するラットと四塩化炭素により急性肝障害を起こさせたラットについて、局所モーメント値を比較検討した結果、肝障害の程度の進行に伴って、オキサシリンの消失の減少および分布容積の増加、血液部体積の増大が明らかとなった。次に、キサンチン酸化酵素による薬物代謝の速度論的評価に適用した結果、アロプリノールからオキシプリノールへの代謝過程は速やかであるが、投与量の増加に伴い飽和し、生成したオキシプリノールが効率的に血液側へと移行することが明らかとなった。これより、細胞膜透過と肝内代謝を速度論的に分離評価し、投与量による各過程の変動を定量的に捉えることができた。

### (2) 肝灌流系における薬物の細胞内移動と胆汁中排泄過程の局所モーメント解析

薬物の胆汁中排泄の時間推移における遅延現象を臓器系で解析することを試みた。血管側と胆管側との間の肝実質細胞をひとつの層として捉え、薬物はその層中を濃度勾配に従って拡散すると考えた肝実質細胞内拡散モデルを構築した。このモデルに基づいて薬物排泄を表すラプラス次元の式を誘導して、高速ラプラス逆変換による非線型最小二乗計算と組み合わせた肝胆系輸送解析法を確立した。推定されたモデルパラメータから肝細胞内移動、胆管膜透過、胆管腔通過の各過程に要する平均通過時間を算出し、肝胆系輸送を三つの移行過程により分離評価した。セフィキシムおよびセフピラミドの胆汁中排泄量に本モデル解析法を適用した結果、肝胆系輸送の律速段階は組織内拡散による細胞内移動であ

ること及び、薬物の細胞内分布は瞬時平衡に至らないことが明らかとなり、薬物の臓器移行性における組織内拡散の重要性を評価できた。次に、代謝過程を含んだ肝胆系輸送についてモデル非依存的解析法を構築した。ケトプロフェン光学異性体の胆汁中排泄から局所モーメント値によるデコンボリューション計算を行い、肝臓ではR体からS体への一方向性の代謝的異性化がおり、大部分がグルクロン酸抱合後に速やかに胆汁中排泄されることを明らかにした。光学異性体間の動態特性の相違は、異性化における立体選択性に起因することがわかった。

### (3) 全身動態系における薬物腸肝循環の局所モーメントの評価

全身系における薬物動態が腸肝循環を示す場合、血中濃度推移から得られる情報には体循環での動態特性のみならず胆汁排泄後の消化管再吸収による局所動態も反映する。腸肝循環を考慮した動態を従来のコンパートメントモデルで解析することは困難であるので、ネットワーク理論に基づいた再循環モデルによる腸肝循環解析法を構築した。さらに、定速注入時における血中濃度推移と胆汁中排泄より腸肝循環の局所モーメント特性値を推定する方法を確立した。セフィキシムの定速注入による全身動態実験を行い、本解析法により腸肝循環特性を表す腸肝循環率および平均循環時間を分離評価できた。次に、代謝過程を含んだ腸肝循環についてモデル非依存的解析法を構築した。ケトプロフェン光学異性体の血漿中濃度推移と胆汁中排泄から局所モーメント値によるデコンボリューション計算を行い、体内におけるR体からS体への代謝的異性化は大部分が肝臓で起こり、この異性化に及ぼす腸管循環の影響を定量的に評価することができた。光学異性体間の血中動態特性の相違は、肝内異性化と胆汁排泄過程における立体選択性に起因することがわかった。

以上著者は、肝臓の構造的特徴と生理機能を保持した状態で、薬物局所動態の詳細な解析が可能な肝臓灌流実験系において局所モーメント解析に基づく動態評価法を確立した。また、全身動態実験系についても再循環理論に基づいた腸肝循環局所動態の評価法を構築した。本法を用いて肝局所レベルにおける分布、消失、代謝、排泄、腸肝循環などの薬物動態を定量的に明らかにすることができた。本研究は、薬物の肝臓内挙動を局所モーメント特性値に基づいて解析し、巨視的モーメントと結び付けることにより全身の薬物動態を定量的に予測する上で有益な基礎的知見を与えるものである。



## 謝 辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、また終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました京都大学薬学部中川照眞教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究の遂行に当たり終始御懇切なる御助言と御指導を戴いた恩師京都大学薬学部山岡 清助教授に深く感謝いたします。

さらに、種々の有益な御助言を戴いた京都大学薬学部黒田義弘助教授、京都大学薬学部渋谷明正助手、塩野義製薬研究所矢野義孝博士、マリオンメレルダウ製薬研究所澤居米市氏、大塚製薬工場研究所内藤真策氏、西村益浩氏、藤沢薬品工業研究所澤本泰治氏に心からの謝意を表します。

本研究の実験の一部に御協力いただきました福山隆子博士、土手宣人修士、大畑由佳修士、日東伸二学士並びに京都大学薬学部薬品分析学教室の諸氏に感謝いたします。

最後に、研究に専心できる時間と自由を与えて下さり、著者の良き理解者でもあった、父潔、母東輝子に心から感謝いたします。

## 論 文 目 録

本研究の主要部分は、以下の学術雑誌に公表した。

### 第I章 肝灌流系における薬物の組織移行と代謝過程の局所モーメント解析

Y. Ohata, K. Yamaoka, H. Yasui, and T. Nakagawa. Consideration on moments of outflow profile in liver perfusion system with change in perfusate flow rate using oxacillin as model drug. *Biol. Pharm. Bull.* **19**:83(1996).

H. Yasui, K. Yamaoka, T. Fukuyama, and T. Nakagawa. Effect of liver intoxication by carbon tetrachloride on hepatic local disposition of oxacillin using moment characteristics as index. *Drug Metab. Dispos.* **23**:779(1995).

H. Yasui, K. Yamaoka, M. Nishimura, S. Naito, and T. Nakagawa. Moment analysis of hepatic local disposition of allopurinol and oxipurinol: Metabolism kinetics from allopurinol to Oxipurinol in the Rat Isolated Perfused Liver. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**:524(1994).

### 第II章 肝灌流系における薬物の細胞内移動と胆汁中排泄過程の局所モーメント解析

H. Yasui, K. Yamaoka, and T. Nakagawa. New hepatocellular diffusion model for analysis of hepatobiliary transport processes of drugs. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **23**:179(1995).

H. Yasui, K. Yamaoka, N. Dote, and T. Nakagawa. Moment analysis of stereo-selective biliary excretion and chiral inversion of ketoprofen enantiomers in perfused rat liver. *J. Pharm. Sci.* **84**:1327(1995).

### 第III章 全身動態系における薬物腸肝循環の局所モーメントの評価

H. Yasui, K. Yamaoka, and T. Nakagawa. Alternative continuous infusion method for analysis of enterohepatic circulation and biliary excretion of cefixime in the rat. *J. Pharm. Sci.* **83**:819(1994).

H. Yasui, K. Yamaoka, and T. Nakagawa. Moment analysis of stereoselective enterohepatic circulation and unidirectional chiral inversion of ketoprofen enantiomers in rat. *J. Pharm. Sci.* **85**: *in press*(1996).



## 引用文献

- 1) Z. Hussein, A. J. McLachlan, and M. Rowland, *Pharm. Res.* 11:1337(1994).
- 2) E. L. Forker, B. A. Luxon, M. Snell, and W. O. Hurmantine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 223:342(1982).
- 3) P. D. Berk and W. Stremmel, *In "Progress in Liver Diseases"* (H. Popper and F. Schaffner, eds.), vol. VII, p. 125. Grune & Stratton, Inc., New York, 1986.
- 4) J. Reichen and G. Paumgartner, *Am. J. Physiol.* 231:734(1976).
- 5) D. K. F. Meijer, R. J. Vonk, K. Keulemans, and J. G. Weitering, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 202:8(1977).
- 6) D. K. F. Meijer, A. Blom, J. G. Weitering, and R. Hornsveld, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 12:43(1984).
- 7) A. W. Wolkoff, C. A. Goresky, J. Sellin, Z. Gatmaitan, and I. M. Arias, *Am. J. Physiol.* 236:E638(1979).
- 8) H. M. Mehendale, S. A. Svensson, C. Baldi, and S. Orrenius, *Eur. J. Biochem.* 149:201(1985).
- 9) K. S. Pang, J. A. Terrell, S. D. Nelson, K. F. Feuer, M. J. Clements, and L. Endrenyi, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 14:107(1986).
- 10) K. Sathirakul, H. Suzuki, K. Yasuda, M. Hanano, O. Tagaya, T. Horie, and Y. Sugiyama, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265:1301(1993).
- 11) K. Sathirakul, H. Suzuki, T. Yamada, M. Hanano, and Y. Sugiyama, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268:65(1994).
- 12) A. S. Nies, D. G. Shand, and G. R. Wilkinson, *Clin. Pharmacokinet.* 1:135(1976).
- 13) D. G. Shand, D. M. Kornhauser, and G. R. Wilkinson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195:424(1975).
- 14) S. Keiding and E. Steiness, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230:474(1984).
- 15) D. J. Morgan, *Pharm. Res.* 6:874(1989).
- 16) K. S. Pang and M. Rowland, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 5:625(1977).
- 17) G. R. Wilkinson and D. G. Shand, *Clin. Pharmacol. Ther.* 18:377(1975).
- 18) L. Bass, S. Keiding, K. Winkler, and N. Tygstrup, *J. Theor. Biol.* 61:393(1976).
- 19) M. Weiss, *J. Math. Biol.* 15:305(1982).
- 20) L. Bass, P. Robinson, and A. J. Bracken, *J. Theor. Biol.* 72:161(1978).
- 21) E. L. Forker and B. Luxton, *Am. J. Physiol.* 235:E648(1978).
- 22) C. A. Goresky, W. H. Ziegler, and G. G. Bach, *Circ. Res.* 27:739(1970).
- 23) C. A. Goresky and G. G. Bach, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 170(1):18(1970).
- 24) B. A. Luxon and R. A. Weisiger, *Am. J. Physiol.* 263:G733(1992).
- 25) B. A. Luxon and R. A. Weisiger, *Math. Biosci.* 113:211(1993).
- 26) M. S. Roberts and M. Rowland, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 14:227(1986).
- 27) M. S. Roberts, S. Fraser, A. Wagner, and L. McLeod, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 18:209(1990).
- 28) J. M. Diaz-Garcia, A. M. Evans, and M. Rowland, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 20:171(1992).
- 29) K. Yamaoka and T. Nakagawa, *J. Chromatogr.* 117:1(1976).
- 30) Y. Yano, K. Yamaoka, Y. Aoyama, and H. Tanaka, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 17:179(1989).
- 31) Y. Yano, K. Yamaoka, T. Minamide, T. Nakagawa, and H. Tanaka, *J. Pharm. Pharmacol.* 42:632(1990).
- 32) Y. Yano, K. Yamaoka, H. Yasui, and T. Nakagawa, *Drug Metab. Dispos.* 19:1022(1991).
- 33) Y. Yano, K. Yamaoka, and H. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.* 37:1035(1989).
- 34) T. Hosono, *Radio Sci.* 16:1015(1981).
- 35) M. Nishimura, K. Yamaoka, H. Yasui, S. Naito, and T. Nakagawa, *Biol. Pharm. Bull.* 17:1301(1994).
- 36) A. B. Littlewood, *Gas chromatography*, p. 164. Academic Press, New York, 1970.
- 37) K. Yamaoka, T. Nakagawa, and T. Uno, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 6:547(1978).
- 38) T. Kakutani, K. Yamaoka, M. Hashida, and H. Sezaki, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 13:609(1985).
- 39) G. E. Mortimore and F. Tietze, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 82:329(1959).
- 40) A. M. Evans, Z. Hussein, and M. Rowland, *J. Pharm. Sci.* 82:421(1993).
- 41) C. H. Chou, A. M. Evans, G. Fornasini, and M. Rowland, *Drug Metab. Dispos.*



- 21:933(1993).
- 42) F.B.Freedman and J.A.Johnson, *Am.J.Physiol.* 216:675(1969).
  - 43) K.S.Pang, W.F.Lee, W.F.Cherry, V.Yuen, J.Accaputo, S.Fayz, A.J.Schwab, and C.A.Goresky, *J.Pharmacokinet.Biopharm.* 16:595(1988).
  - 44) N.M.Bass, J.A.Manning, and R.A.Weisiger, *Am.J.Physiol.* 256:G1041(1989).
  - 45) L.Bass and S.Keiding, *Biochem.Pharmacol.* 37:1425(1988).
  - 46) J.J.Gumucio and J.Chianale, *In "The Liver: Biology and Pathobiology, Second Edition"* (I.M.Arias, W.B.Jakoby, H.Popper, D.Schachter, and D.A.Shafritz, eds.), p.931. Raven Press, Ltd., New York, 1988.
  - 47) I.A.Sherman, S.C.Pappas, and M.M.Fisher, *Am.J.Physiol.* 258:H460(1990).
  - 48) P.M.Huet, C.A.Goresky, J.P.Villeneuve, D.Marleau, and J.O.Lough, *J.Clin.Invest.* 70:1234(1982).
  - 49) D.D.Stark, N.M.Bass, A.A.Moss, B.R.Bacon, J.H.McKerrow, C.E.Cann, A.Brito, and H.I.Goldberg, *Radiology.* 148:743(1983).
  - 50) J.B.Gross, J.Reichen, T.B.Zeltner, and A.Zimmermann, *Hepatology.* 7:457(1987).
  - 51) G.C.Farrell, W.G.E.Cooksley, and L.W.Powell, *Clin.Pharmacol.Ther.* 26:483(1979).
  - 52) M.J.Brodie, A.R.Boobis, C.J.Bulpitt, and D.S.Davies, *Er.J.Clin.Pharmacol.* 20:39(1981).
  - 53) G.C.Farrell and L.Zaluzny, *Gastroenterology.* 85:275(1983).
  - 54) P.M.Huet and J.P.Villeneuve, *Hepatology.* 3:913(1983).
  - 55) R.L.Williams, *N.Engl.J.Med.* 309:1616(1983).
  - 56) A.J.McLean and D.J.Morgan, *Clin.Pharmacokinet.* 21:42(1991).
  - 57) R.Perez-Tamayo, *Hepatology.* 3:112(1983).
  - 58) W.Jimenez, J.Claria, V.Arroyo, and J.Rodes, *J.Gastroenterol.Hepatol.* 7:90(1992).
  - 59) R.O.Recknagel, *Pharmacol.Rev.* 19:184(1967).
  - 60) P.Berthelot, *Gut.* 14:332(1973).
  - 61) R.Callaghan, P.V.Desmond, P.Paull, and M.L.Mashford, *Hepatology.* 18:54(1993).
  - 62) F.Varin and P.M.Huet, *J.Clin.Invest.* 76:1904(1985).
  - 63) J.Reichen, B.Egger, N.Ohara, T.B.Zeltner, T.Zysset, and A.Zimmermann, *J.Clin.Invest.* 82:2069(1988).
  - 64) A.Karmen, *J.Clin.Invest.* 34:131(1955).
  - 65) C.A.Goresky, *Am.J.Physiol.* 204:626(1963).
  - 66) S.C.Tsao, Y.Sugiyama, Y.Sawada, S.Nagase, T.Iga, and M.Hanano, *J.Pharmacokinet.Biopharm.* 14:51(1978).
  - 67) A.Blouin, R.P.Bolender, and E.R.Weibel, *J.Cell.Biol.* 72:441(1977).
  - 68) T.Horn, P.Christoffersen, and J.H.Henriksen, *Hepatology.* 7:77(1987).
  - 69) Y.Murai, T.Nakagawa, K.Yamaoka, and T.Uno, *Chem.Pharm.Bull.* 29:3290(1981).
  - 70) G.Giorgi and G.Segre, *J.Pharmacokinet.Biopharm.* 1:217(1973).
  - 71) C.A.Goresky, *Am.J.Physiol.* 245:G1(1983).
  - 72) G.B.Elion, S.Callahan, H.Nathan, S.Bieber, R.W.Rundles, and G.H.Hitchings, *Biochem.Pharmacol.* 12:85(1963).
  - 73) R.W.Rundles, J.B.Wyngaarden, and G.H.Hitchings, *Trans.Assoc.Am.Physicians.* 76:126(1963).
  - 74) G.B.Elion, *Ann.Rheum.Dis.* 25:608(1966).
  - 75) R.Hille, and V.Massey, *Pharmac.Ther.* 14:249(1981).
  - 76) G.B.Elion, A.Kovensky, and G.H.Hitchings, *Biochem.Pharmacol.* 15:863(1966).
  - 77) T.A.Krenitsky, G.B.Elion, and R.A.Strelitz, *J.Biol.Chem.* 242:2675(1967).
  - 78) K.S.Pang, *Res.Comm.Chem.Pathol.Pharmacol.* 26:317(1979).
  - 79) K.S.Pang and M.Rowland, *J.Pharmacokinet.Biopharm.* 5:681(1977).
  - 80) M.S.Roberts and M.Rowland, *J.Pharmacokinet.Biopharm.* 14:289(1986).
  - 81) R.Boulieu, C.Bory, and P.Baltassat, *J.Chromatogr.* 307:469(1984).
  - 82) E.D.Jarasch, G.Bruder, and H.W.Heid, *Acta.Physiol.Scand.* 548(Suppl.):39(1986).
  - 83) A.Kooij, W.M.Frederiks, R.Gossrau, and C.J.F. van Noorden, *J.Histo.Cytochem.* 39:87(1991).
  - 84) G.B.Elion, T.F.Yu, and A.B.Gutman, *Am.J.Med.* 45:69(1968).



- 85) K. S. Pang and J. R. Gillette, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **207**:178(1978).
- 86) X. Xu and K. S. Pang, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **17**:645(1989).
- 87) M. V. St-Pierre, D. van den Berg, K. S. Pang, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **18**:423(1990).
- 88) G. Giorgi and G. Segre, *J. Pharmacokin. Biopharm.* **1**:217(1973).
- 89) T. Iga, M. Yokota, Y. Sugiyama, S. Awazu, and M. Hanano, *Biochem. Pharmacol.* **29**:1291(1980).
- 90) T. Kakutani, K. Endo, E. Nara, S. Nakazora, and M. Hashida, *Pharm. Res.* **9**:908(1992).
- 91) D. K. F. Meijer, A. Blom, J. G. Weitering, and R. Hornsvelt, *J. Pharmacokin. Biopharm.* **12**:43(1984).
- 92) P. L. M. Jansen, G. M. M. Groothuis, W. H. M. Peters, and D. F. M. Meijer, *Hepatology.* **7**:71(1987).
- 93) K. Nishida, C. Tonegawa, T. Kakutani, M. Hashida, and H. Sezaki, *Pharm. Res.* **6**:140(1989).
- 94) E. Tipping and B. Ketterer, *Biochem. J.* **195**:441(1981).
- 95) R. J. Stock, E. V. Cilento, and R. S. McCuskey, *Hepatology.* **9**:75(1989).
- 96) K. Sathirakul, H. Suzuki, K. Yasuda, M. Hanano, and Y. Sugiyama, *Biol. Pharm. Bull.* **16**:273(1993).
- 97) H. Sakamoto, S. Hirose, Y. Mine, S. Goshima, M. Nishida, and S. Kuwahara, *Chemotherapy (Japan).* **33(S6)**:157(1985).
- 98) Y. Tokuma, M. Sekiguti, T. Fujiwara, and H. Noguchi, *Xenobio. Metab. Dispos.* **2**:637(1987).
- 99) H. Matsui, K. Yano, and T. Okuda, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **22**:213(1982).
- 100) H. Imasaki, Y. Enjoji, H. Matsui, R. Kawai, and N. Kawamura, *Chemotherapy (Japan).* **31(S1)**:124(1983).
- 101) R. H. Guy and J. Hadgraft, *J. Pharmacokin. Biopharm.* **11**:189(1983).
- 102) K. Kubota and T. Ishizaki, *J. Pharmacokin. Biopharm.* **13**:55(1985).
- 103) A. B. Fulton, *Cell.* **30**:345(1982).

- 104) S. S. Adams, P. Bresloff, and C. G. Mason, *J. Pharm. Pharmacol.* **28**:256(1976).
- 105) A. Buttinoni, M. Ferrari, M. Colombo, and R. Ceserani, *J. Pharm. Pharmacol.* **35**:603(1983).
- 106) K. Brune, G. Geisslinger, and S. M. Soglowek, *J. Clin. Pharmacol.* **32**:944(1992).
- 107) A. J. Hutt and J. Caldwell, *J. Pharm. Pharmacol.* **35**:693(1983).
- 108) F. Jamali, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **13**:1(1988).
- 109) J. Caldwell, A. J. Hutt, and S. F. Giguex, *Biochem. Pharmacol.* **37**:105(1988).
- 110) A. Rubin, M. P. Knadler, P. P. K. Ho, L. D. Bechtol, and R. L. Wolen, *J. Pharm. Sci.* **74**:82(1985).
- 111) A. C. Rudy, P. M. Knight, D. C. Brater, and S. D. Hall, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **259**:1133(1991).
- 112) H. Cheng, J. D. Rogers, J. L. Demetriades, S. D. Holland, J. R. Seibold, and E. Depuy, *Pharm. Res.* **11**:824(1994).
- 113) Y. Nakamura, T. Yamaguchi, S. Takahashi, S. Hashimoto, K. Iwatani, and Y. Nakagawa, *J. Pharmacobio-Dyn.* **4**:s-1(1981).
- 114) K. M. Knights, R. Drew, and P. J. Meffin, *Biochem. Pharmacol.* **37**:3539(1988).
- 115) R. D. Knihinicki, K. M. Williams, and R. O. Day, *Biochem. Pharmacol.* **38**:4389(1989).
- 116) R. D. Knihinicki, R. O. Day, and K. M. Williams, *Biochem. Pharmacol.* **42**:1905(1991).
- 117) E. W. Berry and F. Jamali, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **258**:695(1991).
- 118) P. Jeffrey, G. T. Tucker, A. Bye, H. K. Crewe, and P. A. Wright, *J. Pharm. Pharmacol.* **43**:715(1991).
- 119) T. S. Tracy and S. D. Hall, *Drug Metab. Dispos.* **20**:322(1992).
- 120) Q. Xiaotao and S. D. Hall, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **266**:845(1993).
- 121) W. R. Shieh and C. S. Chen, *J. Biol. Chem.* **268**:3487(1993).
- 122) S. Sattari and F. Jamali, *Chirality.* **6**:435(1994).
- 123) R. T. Foster, F. Jamali, A. S. Russell, and S. R. Alballa, *J. Pharm. Sci.* **77**:70(1988).
- 124) R. T. Foster, F. Jamali, A. S. Russell, and S. R. Alballa, *J. Pharm. Sci.* **77**:191(1988).



- 125) R. T. Foster and F. Jamali, *Drug Metab. Dispos.* 16:623(1988).
- 126) S. Iwakawa, X. He, S. Hashimoto, C. Volland, L. Z. Benet, and E. T. Lin, *Drug Metab. Dispos.* 19:717(1991).
- 127) T. Kakutani, R. Atsumi, E. Sumimoto, and M. Hashida, *Chem. Pharm. Bull.* 35:4907(1987).
- 128) M. Yagi, A. Shibukawa, and T. Nakagawa, *Chem. Pharm. Bull.* 38:2513(1990).
- 129) A. Abas and P. J. Meffin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240:637(1987).
- 130) T. Kakutani, E. Nara, and M. Hashida, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 18:449(1990).
- 131) R. A. Weisiger, C. M. Mendel, and R. R. Cavalieri, *J. Pharm. Sci.* 75:233(1986).
- 132) A. Shibukawa, A. Terakita, J. Y. He, and T. Nakagawa, *J. Pharm. Sci.* 81:710(1992).
- 133) B. E. Dahlstrom and L. K. K. Paalzow, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 6:505(1978).
- 134) W. A. Colburn, P. C. Hirom, R. J. Parker, and P. Milburn, *Drug Metab. Dispos.* 7:100(1979).
- 135) P. V. Pedersen and R. Miller, *J. Pharm. Sci.* 69:204(1980).
- 136) P. V. Pedersen and R. Miller, *J. Pharm. Sci.* 69:394(1980).
- 137) R. Miller, *J. Pharm. Sci.* 73:1376(1984).
- 138) G. M. Pollack and K. L. R. Brouwer, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 19:189(1991).
- 139) F. L. S. Tse, F. Ballard, and J. Skinn, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 10:455(1982).
- 140) J. E. P. Ribera, F. T. Molina, M. C. G. Carbonell, J. C. Aristorena, and J. M. P. Delfina, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 19:647(1991).
- 141) K. S. Pang and J. R. Gillette, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 6:355(1978).
- 142) T. A. Shepard, R. H. Reuning, and L. J. Aarons, *J. Pharm. Sci.* 74:227(1985).
- 143) T. A. Shepard and R. H. Reuning, *Pharm. Res.* 4:195(1987).
- 144) M. Kurita, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 19:469(1991).
- 145) T. A. Shepard, G. F. Lockwood, L. J. Aarons, and I. D. Abrahams, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 17:327(1989).
- 146) K. Yamaoka, M. Kanba, Y. Toyoda, Y. Yano, and T. Nakagawa, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 18:545(1990).
- 147) M. Weiss and W. Forster, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 16:287(1979).

- 148) W. R. Gillespie, *Pharm. Res.* 8:254(1991).
- 149) P. S. Collier, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 11:93(1983).
- 150) R. A. Siegel, *J. Pharm. Sci.* 75:627(1986).
- 151) K. Yamaoka, T. Nakagawa, and T. Uno, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 6:165(1978).
- 152) S. Riegelman, J. Loo, and M. Rowland, *J. Pharm. Sci.* 57:128(1968).
- 153) C. R. Kowarski and A. A. Kowarski, *J. Pharm. Sci.* 69:1222(1980).
- 154) S. Menzel, C. Sauernheimer, K. Brune, and G. Geisslinger, *Biochem. Pharmacol.* 47:1267(1994).
- 155) N. Dubois, F. Lapique, M. H. Maurice, M. Pritchard, S. F. Gigueux, J. Magdalou, M. Abiteboul, G. Siest, and P. Netter, *Drug Metab. Dispos.* 21:617(1993).
- 156) C. Volland, H. Sun, J. Dammeyer, and L. Z. Benet, *Drug Metab. Dispos.* 19:1080(1991).